

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



**Καραγκιόζη Ευδοξία**

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ  
ΣΤΗΝ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΦΥΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ  
ΕΝΔΗΜΙΚΑ ΦΥΤΑ ΕΝΟΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.**

**Φεβρουάριος 2017, Λάρισα**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

**Καραγκιόζη Ευδοξία**

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ  
ΣΤΗΝ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΦΥΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ  
ΕΝΔΗΜΙΚΑ ΦΥΤΑ ΕΝΟΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.

*THE IMPACT OF SEASONALITY AND PLANT SPECIES ON THE  
COMPOSITION OF THE EPIPHYTIC FUNGAL COMMUNITY IN  
ENDEMIC PLANTS OF A MEDITERRANEAN ECOSYSTEM.*

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Επιβλέπων Δημήτριος Καρπούζας	Μέλος Καλλιόπη Παπαδοπούλου	Μέλος Δημήτριος Μόσσιαλος
Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών	Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το θέμα αυτό, καθώς και για την καθοδήγησή του, τις συμβουλές του και την διδακτική και ηθική στήριξή του.

Ευχαριστίες, επίσης, θα ήθελα να εκφράσω και στα άλλα μέλη της επιτροπής, την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον Επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτριο Μόσσιαλο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα κ. Κατσούλα Αθανασία για την σημαντική της βοήθεια και συμβολή στην εκπόνηση της πτυχιακής μου μελέτης, καθώς και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία σε όλη τη διάρκεια της συνύπαρξής μας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη που μου έδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

## Περίληψη

Η μελέτη αυτή εστίασε στη διερεύνηση της δομής και ποικιλότητας της μυκητιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας ενός Μεσογειακού οικοσυστήματος σε δύο διαφορετικές εποχιακές περιόδους, χειμώνα και καλοκαίρι. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν 8 είδη φυτών τα οποία κυριαρχούσαν στο συγκεκριμένο οικοσύστημα: *Arbutus unedo*, *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Myrtus communis*, *Phillyrea angustifolia*, *Lavandula stoechas*, *Cistus incanus* και *Melissa officinalis*. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η σύνθεση της επίφυτης κοινότητας των μυκήτων στα διάφορα φυτά με χρήση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE). Ακολουθώντας τα κυριότερα μέλη της επίφυτης κοινότητας των μυκήτων αναγνωρίστηκαν με την χρήση βιβλιοθηκών κλώνων. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι η εποχικότητα είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει την ποικιλότητα της κοινότητας των επίφυτων μυκήτων στο μελετούμενο οικοσύστημα, ενώ το είδος του φυτού δεν φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην δομή της κοινότητας. Από τις βιβλιοθήκες κλώνων που αναλύθηκαν καταγράφηκε μια σχετικά υψηλή ποικιλότητα μυκήτων στα διάφορα φυτά όπου κυριάρχησαν Ασκομύκητες και κυριότερα μύκητες των γενών *Cladosporium* και *Botrytis* ενώ εντοπίστηκαν σε αρκετά φυτά έντονη παρουσία ζυμών που ανήκουν στο φύλο των Βασιδιομυκήτων με κυριότερους αντιπρόσωπους μύκητες του γένους *Cryptococcus*. Περαιτέρω μελέτες θα μελετήσουν σε μεγαλύτερο βάθος την ποικιλότητα των επίφυτων μυκήτων στο συγκεκριμένο οικοσύστημα με την χρήση τεχνικών αλληλούχισης νέας γενεάς.

## Abstract

This study focused on the investigation of the diversity of the phyllosphere fungal community in a Mediterranean ecosystem in two different seasonal periods, winter and summer. To this aim, leaves from eight dominant plant species in the studied habitats namely *Arbutus unedo*, *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Myrtus communis*, *Phillyrea angustifolia*, *Lavandula stoechas*, *Cistus incanus* and *Melissa officinalis* were selected. The composition of the epiphytic fungal community in the different plants was determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Subsequently the main members of the epiphytic fungal community were determined by cloning. The results of statistical analysis showed that seasonality is the main factor that determines the structure of the fungal community on the phyllosphere of the studied plants, while the plant species did not have a major effect. Clone libraries showed a rather rich diversity of fungi on the phyllosphere of the different plants. Ascomycetes were dominant with strains belonging to the genera *Cladosporium* and *Botrytis* being the most dominant. In addition several basidiomycetous yeasts were observed in the phyllosphere of the studied plants with the most commonly detected belonging to the genus *Cryptococcus*. Further studies are going to study in more depth the diversity of epiphytic fungi in this ecosystem using next generation sequencing approaches.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
1.1. ΦΥΛΛΟΣΦΑΙΡΑ: ΤΙ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΙ; .....	6
1.1.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΕΠΙΦΥΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	7
1.1.3. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ.....	9
1.2. ΕΠΙΦΥΤΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ .....	9
1.3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	11
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	12
2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ.....	12
2.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΦΥΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ.....	14
2.2.1 Εξαγωγή DNA.....	14
2.2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	14
2.2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης .....	18
2.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE).....	18
2.2.5. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση .....	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	21
3.1. Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	21
3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE) .....	22
4. Συζήτηση.....	30
4.1. Η επίδραση του φυτού και της περιόδου στην δομή της κοινότητας των επίφυτων μυκήτων.....	30
4.2. Ποικιλότητα των επίφυτων μυκήτων στη φυλλόσφαιρα όπως καταγράφηκε με την μέθοδο DGGE και βιβλιοθήκες κλώνων.....	31
4.2.1. ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ .....	31
4.2.2. ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΕΣ .....	41
5. Τελικά Συμπεράσματα.....	43
6. Βιβλιογραφία.....	43

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. ΦΥΛΛΟΣΦΑΙΡΑ: ΤΙ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΙ;

Το φυτό αποτελείται από δύο διαφορετικά τμήματα, το υπέργειο και το υπόγειο. Τα υπέργεια μέρη των φυτών αποτελούνται από τα φύλλα, τους βλαστούς, τα άνθη και τους καρπούς (Whipps et al. 2008) και συνήθως αποικίζονται από μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, αρχαία, ζύμες, οι οποίοι προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και τα προστατεύουν (Wilson 1990). Τα βακτήρια είναι οι πιο πολυάριθμοι και ποικίλοι αποικιστές των φύλλων, με μετρήσεις σε θρεπτικά μέσα να δείχνουν ότι οι πληθυσμοί τους κυμαίνονται μεταξύ  $10^2$  και  $10^{12}$  κύτταρα ανά γραμμάριο φύλλου (Thompson et al. 1993). Ορισμένα είδη μικροοργανισμών μπορούν να απομονωθούν είτε από το εσωτερικό των φυτικών ιστών και ονομάζονται ενδοφυτικοί, είτε από τις επιφάνειες των φυτικών ιστών και ονομάζονται επίφυτοι (Lindow & Brandl 2003).

Η φυλλόσφαιρα είναι ένα oligότροφο περιβάλλον με ετερογένη ανάγλυφο και ανομοιόμορφη κατανομή πηγών C και άλλων θρεπτικών στοιχείων όπου οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε καταπονήσεις, συμπεριλαμβανομένων την ακραία έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, και τη περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού (Lindow & Brandl 2003).

Συγκριτικά με τα περισσότερα ενδιαιτήματα που αποικίζονται από μικροοργανισμούς, η φυλλόσφαιρα έχει μελετηθεί σε περιορισμένο βαθμό, το οποίο δε συνάδει με την αφθονία των φυτών στον κόσμο και τους ρόλους των διαφόρων μικροοργανισμών της φυλλόσφαιρας σε σημαντικές διεργασίες. Τα φύλλα αποτελούν ένα πολύ μεγάλο μικροβιακό περιβάλλον. Εκτιμάται ότι η επίγεια επιφάνεια των φύλλων που μπορεί να αποικιστεί από τα μικρόβια είναι περίπου  $4 \times 10^8 \text{ km}^2$  (Kinkel 1997). Η φυλλόσφαιρα αποτελεί ενδιαίτημα μεγάλης γεωργικής και περιβαλλοντικής σημασίας. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις για σημαντικές αλληλεπιδράσεις των μικροβιακών αποικιστών της φυλλόσφαιρας που ενδέχεται να επηρεάσουν την λειτουργικότητα των φυτικών πληθυσμών των φυτών καθώς και την ποιότητα και παραγωγικότητα των καλλιεργούμενων φυτών. Τα βακτήρια της φυλλόσφαιρας είναι πιθανό να προωθήσουν την ανάπτυξη των φυτών, να προκαλέσουν αναστολή ή αύξηση του αποικισμού καθώς και μόλυνση των ιστών από φυτικά παθογόνα (Rasche et al. 2006). Ομοίως, οι μύκητες των φύλλων ενδέχεται να αποτρέψουν την προσβολή από φυτοφάγα ζώα, να παρέχουν προστασία έναντι παθογόνων παραγόντων και να αυξήσουν την ανεκτικότητα στην ξηρασία (Arnold et al. 2003). Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις στη φυλλόσφαιρα καθορίζουν το βαθμό στον οποίο τα ανθρώπινα παθογόνα είναι ικανά να αποικίσουν και να επιβιώσουν σε φυτικούς ιστούς, ένα θέμα με ολοένα και μεγαλύτερη σημασία λόγω των αυξημένων περιπτώσεων των ανθρώπινων ασθενειών που σχετίζονται με την κατανάλωση φρέσκων φρούτων και λαχανικών (Whipps et al. 2008). Επιπροσθέτως υπάρχουν ενδείξεις για τους λειτουργικούς ρόλους της μικροβιακής κοινότητας της φυλλόσφαιρας, που ανάλογα με το μέγεθος του οικοτόπου θα μπορούσε να έχει και παγκόσμια σημασία. Σε αυτές περιλαμβάνονται η δέσμευση του αζώτου (Freiberg 1998), η αποδόμηση μεθανόλης (Corpe & Rheem 1989) και η νιτροποίηση (Papen et al. 2002).

Για να κατανοήσουμε την ποικιλομορφία και τη δομή των μικροβιακών κοινοτήτων της φυλλόσφαιρας, είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε τους βιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες που ελέγχουν τη δυναμική τους στην επιφάνεια των φυλλών.

### **1.1.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΕΠΙΦΥΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

Η προέλευση των μικροοργανισμών στη φυλλόσφαιρα μπορεί να είναι πολύπλευρη. Επίφυτοι μύκητες, ζύμες και βακτήρια είναι πιθανό να καταλήξουν στην επιφάνεια του φύλλου μέσω μετάδοσης από έντομα, σπόρια, την ατμόσφαιρα, οφθαλμούς δέντρων, σπόρους των ετήσιων φυτών και τα ζώα, ακόμα και μέσω αβιοτικών διεργασιών μεταφοράς με την βροχή ή τον αέρα ακόμη και από το έδαφος για τα φύλλα που έχουν μικρή απόσταση από την επιφάνεια αυτού. Οι αβιοτικοί παράγοντες μεταφοράς αποτελούν και τις πιο σημαντικές πηγές για την αποίκιση των νέων φυτών και φύλλων, καθώς είναι πηγή των βακτηρίων που έχουν ήδη προσαρμοστεί στη φυλλόσφαιρα (Manceau and Kasempour 2002), όμως η μεταφορά σπορίων με τον αέρα είναι η πιθανότερη πηγή μόλυνσεων από μύκητες και σε μεγάλο βαθμό πολύ σημαντική και για τις υπόλοιπες κατηγορίες της μικροχλωρίδας (Andrews & Harris 2000).

Οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν την φυλλόσφαιρα συχνά απαντώνται ως συσσωματώματα ή βιουμένια που αποτελούνται από βακτήρια και μύκητες (Morris et al. 1997). Οι μικροοργανισμοί που δεν πολλαπλασιάζονται ή αναπτύσσονται στην φυλλόσφαιρα θεωρούνται παροδικά επίφυτοι, ενώ εκείνοι που έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού σε φύλλα απουσία πληγών είναι γνωστοί ως υπολειμματικά επίφυτοι (Suslow 2002).

### **1.1.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ ΦΥΛΛΟΣΦΑΙΡΑ.**

Η φυλλόσφαιρα λόγω της έκθεσης της στο περιβάλλον, τείνει να είναι ευάλωτη σε πλήθος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Αυτούς τους παράγοντες πρέπει να υπερνικήσουν οι μικροοργανισμοί για την εγκαθίδρυση τους επί των φύλλων. Ως αβιοτικοί παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν η βροχή, η θερμοκρασία, ο αέρας καθώς και η ακτινοβολία. Πιο συγκεκριμένα η μικροχλωρίδα της ατμόσφαιρας μπορεί να διαφέρει ως προς τη σύνθεση και τη συγκέντρωσή της εποχιακά αλλά και κατά τη διάρκεια της ημέρας, εξαρτώμενη από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως οι μεταβολές της θερμοκρασίας, η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), η ατμοσφαιρική ρύπανση (Perazzolli et al. 2014), καθώς και οι βροχοπτώσεις και οι ισχυροί άνεμοι που επηρεάζουν άμεσα την μετανάστευση των μικροοργανισμών στη φυλλόσφαιρα (Zak 2002). Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών μπορεί να ποικίλουν σε μέγεθος μεταξύ των φυτικών ειδών, ακόμα και μεταξύ του ίδιου είδους, ανάμεσα σε σύντομες χρονικές περιόδους (Hirano & Uppel 1989).

Ως βιοτικοί παράγοντες μπορούν να καθοριστούν το ίδιο το φυτό καθώς και οι μικροοργανισμοί που διαβιούν στη φυλλόσφαιρα. Πιο συγκεκριμένα τα μέλη της μικροβιακής κοινότητας ανταγωνίζονται για να κερδίσουν θρεπτικά στοιχεία και χώρο για την ανάπτυξή τους (Lindow & Brandl 2003). Η τοπική βλάστηση, καθώς και οι περιοχές



φυτικής παραγωγής και γεωργικών πρακτικών, όπως η συγκομιδή και η καλλιέργεια, επηρεάζουν επίσης την ατμοσφαιρική μικροχλωρίδα και τον αποικισμό των κοντινών φυτών (Lighthart 1997).

Οι μικροοργανισμοί που έχουν φτάσει στη φυλλόσφαιρα πρέπει να εγκατασταθούν και να αποικίσουν το φύλλο ώστε να γίνουν υπολειμματικά επίφυτοι. Οι πιο κοινές θέσεις αποικισμού στα φύλλα των φυτών είναι στις συνδέσεις μεταξύ των κυτταρικών τοιχωμάτων της επιδερμίδας, ιδιαίτερα στις προστατευμένες περιοχές των αυλακώσεων κατά μήκος των φλεβών, στα στόματα και στη βάση των τριχωμάτων (Mariano & McCarter 1993). Επίσης, βρίσκονται κάτω από την επιδερμίδα, σε κοιλότητες της επιδερμίδας και σε θέσεις που υπάρχουν μόνο σε συγκεκριμένα φυτά, όπως κοιλότητες στοματίων σε πικροδάφνες (Beattie & Lindow 1999). Σαφώς, δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί που φτάνουν στο φυλλόσφαιρα σε θέση να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν. Η επιβίωση τους εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, από τα φυσικοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά του φυτού και από τις ειδικές ιδιότητες που εμφανίζουν οι μικροοργανισμοί της φυλλόσφαιρας. Αυτοί οι παράγοντες από κοινού καθορίζουν τη δομή και την ποικιλομορφία της μικροβιακής κοινότητας. Επιπλέον, δεδομένου ότι ένα σημαντικό ποσοστό των μικροοργανισμών που εντοπίζονται στην φυλλόσφαιρα φαίνεται να μην έχουν αναφερθεί πουθενά αλλού στο παρελθόν έχει προταθεί ότι ορισμένοι εξ αυτών μπορεί να εμφανίζουν μια εξειδίκευση σε αυτό το ενδιαίτημα (Yang et al. 2001).

Η εγκατάσταση των μικροοργανισμών στην φυλλόσφαιρα καθορίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των φύλλων και των περιβαλλοντικών συνθηκών. Το πρώτο σημείο επαφής των μεταναστευτικών μικροοργανισμών στην φυλλόσφαιρα είναι η εφυμενίδα. Αυτή η κηρώδης επιφάνεια εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες: εμποδίζει τη διάχυση, μειώνοντας την απώλεια του νερού και θρεπτικών, λειτουργεί ως μονωτικό για να ελαχιστοποιηθούν οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, αποτελεί προστασία από παθογόνα και παρέχει υδατοαπωθητικότητα. Η τελευταία είναι ιδιαίτερα σημαντική για την πρόληψη της μετανάστευσης των μικροοργανισμών στην επιφάνεια του φύλλου (Beattie 2002). Επίσης αποδείχτηκε ότι ολόκληρο το βακτηριακό κύτταρο λειτουργεί ως βιοαισθητήρας για σακχαρόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη, κι έτσι εξηγείται ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι παρόντες μόνο σε διακριτές εντοπισμένες θέσεις του φύλλου, όπου αποτελούν πηγές των ζακχάρων αυτών (Lindow & Leveau 2002). Άλλα θρεπτικά συστατικά, όπως πηγές αζώτου ή σιδήρου δεν θεωρείται ότι περιορίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών της φυλλόσφαιρας, όπως συμβαίνει με τις πηγές άνθρακα (Lindow & Brandl 2003).

Τα φύλλα των φυτών, επίσης, απελευθερώνουν ένα ευρύ φάσμα πτητικών οργανικών ενώσεων. Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν μικρά μόρια όπως το CO<sub>2</sub> και ακετόνη, μόρια μεσαίου μοριακού βάρους συμπεριλαμβανομένων των τερπενοειδών και σειρά από αλδεΐδες και αλκοόλες, μεγάλα μόρια όπως υδρογονάνθρακες μακράς αλυσίδας και σεσκιτερπενοειδή, καθώς και σουλφίδια και ενώσεις που περιέχουν άζωτο. Δεν είναι σαφές αν αυτά θα μπορούσαν να είναι άμεσα θρεπτικές πηγές, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι μερικές από αυτές τις ενώσεις μπορεί να είναι ανασταλτικές ή τοξικές για ορισμένους μύκητες (Mechaber 2002). Υπάρχουν, επίσης, στοιχεία που δείχνουν ότι τα φυτά μπορούν να απελευθερώνουν έναν αριθμό ενώσεων ως απόκριση σε βλάβες οι οποίες, όχι μόνο

προάγουν την μικροβιακή ανάπτυξη, αλλά μπορεί και να αναστέλλουν επιλεκτικά την ανάπτυξη μικροβίων (Dingman 2000).

### 1.1.3. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ

Εκτός από τους φυτικούς και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, τα χαρακτηριστικά των ίδιων των μικροοργανισμών καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα τους να αποικίσουν την επιφάνεια του φύλλου. Για ορισμένους μικροοργανισμούς, αυτό αντικατροπτίζει την εγγενή ικανότητά τους να επιβιώνουν στο υπάρχον ενδιαίτημα ενώ άλλα είναι ικανά να τροποποιούν το μικροπεριβάλλον στο οποίο εκτίθενται.

Αναλύσεις σε πληθυσμούς επίφυτων μικροοργανισμών έδειξαν ότι η αντοχή σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) είναι πιθανό να είναι ένα γεγονός εξελικτικής πίεσης για την επιβίωση και ανάπτυξη σε αυτό το ενδιαίτημα, και οι περισσότεροι μικροοργανισμοί της φυλλόσφαιρας που έχουν απομονωθεί είναι ικανοί να αντέχουν σε υψηλά επίπεδα υπεριώδους ακτινοβολίας (Sundin 2002). Σε μύκητες, οι σκούρες μελανόχρωμες χρωστικές πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο ως προστατευτική χρωστική ουσία μαζί με πάχυνση της εφυμενίδας που προκαλείται από ακτινοβολία UV-B (Sundin 2002).

Επίσης, όπως προαναφέραμε το χαμηλό επίπεδο διαθεσιμότητας νερού και θρεπτικών συστατικών αποτελούν βασικούς περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη μικροοργανισμών στη φυλλόσφαιρα, έτσι οι επίφυτοι μικροοργανισμοί εμφανίζουν μια ποικιλία μηχανισμών για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Για παράδειγμα, μερικά επίφυτα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.* μπορούν να απελευθερώσουν επιφανειοδραστικές ουσίες που μεταβάλουν την πολικότητα των κυτταρικών τους επιφανειών και αυξάνουν έτσι τη διαθεσιμότητα θρεπτικών οργανικών ουσιών που βρίσκονται διαθέσιμα στα φύλλα (Bunster et al. 1989).

Όπως σημειώθηκε παραπάνω, η κατανομή των βακτηρίων στην επιφάνεια του φύλλου δεν είναι ομοιόμορφη καθώς οι μικροοργανισμοί οργανώνονται με την μορφή συσσωματωμάτων που δημιουργούνται με την παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS), τα οποία μπορούν να προστατεύουν τα βακτήρια από εξωγενείς καταπονήσεις και βοηθούν την σταθεροποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια του φύλλου. Όπως και τα βιουμένια, τα συσσωματώματα αυτά μπορούν επίσης να προστατεύσουν από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV), τα βακτηριοκτόνα, και ευνοούν τις ανταλλαγές γενετικού υλικού ιδίως μέσω της μεταφοράς πλασμιδίου (Morris et al. 2002).

## 1.2. ΕΠΙΦΥΤΟΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

Οι μύκητες αποτελούν, μαζί με τα βακτήρια, τους πιο σημαντικούς αποδομητές της οργανικής ύλης της βιόσφαιρας. Το εκτεταμένο δίκτυο υφών του μυκηλίου τους λειτουργεί σαν μια τεράστια επιφάνεια απορρόφησης θρεπτικών. Υπάρχουν σαπροφυτικοί μύκητες, που τρέφονται με νεκρή οργανική ύλη και μπορούν να αποσυνθέσουν ξυλεία, χαρτί, ύφασμα, δέρμα κλπ. Διασπούν την κυτταρίνη του ξύλου και από τα μόρια γλυκόζης που απελευθερώνονται προσλαμβάνουν τον άνθρακα που τους χρειάζεται. Από την αποδόμηση των πρωτεϊνών προσλαμβάνουν το άζωτο, ενώ το οξυγόνο και το υδρογόνο τα παίρνουν

από το νερό και τους υδατάνθρακες. Υπάρχουν και οι παρασιτικοί μύκητες που εισέρχονται στον ξενιστή και διαθέτουν εξειδικευμένες μυκηλιακές υφές (*haustoria*) που δημιουργούν ένα θρεπτικό μονοπάτι μεταξύ του μύκητα και του κυττάρου-ξενιστή.

Η διάκριση μεταξύ ενδόφυτων και επίφυτων μερικές φορές είναι ασαφής και ορισμένοι μύκητες μπορούν να εμφανιστούν ως ενδόφυτοι και επίφυτοι ταυτόχρονα. Παραδείγματα αποτελούν ο μύκητας *Ascochyta* sp. σε φυτό *Fagus crenata*, οι μύκητες *Colletotrichum gloeosporioides*, και *Phomopsis* sp. σε φυτό *Swida controversa*. Μερικά ενδόφυτα έχουν μια μεγαλύτερη ή μικρότερη επίφυτη φάση στον κύκλο ζωής τους, ενώ ορισμένοι επίφυτοι μύκητες αποικίζουν και σε εσωτερικούς ιστούς, ειδικά των φύλλων που βρίσκονται σε γήρανση (Osono 2006).

Οι ζύμες αποτελούν την πιο συχνά απαντούμενη ομάδα επίφυτων μυκήτων στη φυλλόσφαιρα ενώ οι υπόλοιπες ομάδες μυκήτων απαντώνται στη φυλλόσφαιρα κυρίως με την μορφή αδρανοποιημένων σπορίων και όχι ως ενεργά μυκήλια όπως συμβαίνει σε γηραιότερα φύλλα (Andrews & Harris 2000). Οι πληθυσμοί των ζυμών στα φύλλα μπορούν να κυμαίνονται μεταξύ 10 και  $10^{10}$  CFU g<sup>-1</sup> φύλλου. Η ποικιλογένεια των καλλιεργήσιμων ζυμών φαίνεται να περιορίζεται κυρίως στα γένη *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* και *Rhodotorula*, όμως ο συνολικός αριθμός των ειδών μπορεί να ξεπεράσει τα 40, όπου διάφορα είδη από το καθένα συνυπάρχουν στην φυλλόσφαιρα μαζί με μια σειρά από άλλα γένη που εμφανίζονται λιγότερο συχνά (Inacio, et al. 2002).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένοι επίφυτοι μύκητες είναι ωφέλιμοι για τους ξενιστές τους. Μπορούν να ενεργούν ως προαγωγείς της ανάπτυξης των φυτών, να προσδίδουν αντοχή σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις και στις επιθέσεις παθογόνων και λοιπών φυτοπαρασίτων, όπως για παράδειγμα την μείωση της γευστικότητας του ιστού του ξενιστή για τα φυτοφάγα μέσω της παραγωγής τοξικών ουσιών (Varanda et al. 2016). Ο ρόλος των ενδοφύτων στην άμυνα των φυτών έναντι των παθογόνων επιτυγχάνεται μέσω διαφορετικών μηχανισμών, που ονομάζεται επαγωγή της συστηματικής αντίστασης, μέσω της συσσώρευσης πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παθογένεση (PR), έκφραση των γονιδίων της άμυνας του φυτού, που οδηγεί σε παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που αναστέλλουν την ανάπτυξη μυκήτων και τον ανταγωνισμό (Varanda et al. 2016). Μερικοί μύκητες που αποικίζουν καλλιέργεια αμπέλου έχουν δείξει ανταγωνιστικές ιδιότητες έναντι ορισμένων σημαντικών φυτοπαθογόνων. Μύκητες που ανήκουν στο γένος *Alternaria* και *Epicoccum* έδειξαν ανταγωνιστικές ιδιότητες κατά των μυκήτων *Plasmopara viticola* και *Botrytis cinerea* που προκαλούν σημαντικές ασθένειες της αμπέλου (Polizzotto et al. 2009).

Ο πληθυσμός των μυκήτων στη φυλλόσφαιρα επηρεάζεται από παράγοντες, όπως η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, η υγρασία, η ηλικία και ο τύπος των φύλλων, η παρουσία αναστολέων και η άφιξη ή η απώλεια βιώσιμων μέσων αύξησης και πολλαπλασιασμού. Στην περίπτωση των μυκήτων, η ανάπτυξή τους στην επιφάνεια των φύλλων ενισχύεται γενικά όταν τα επίπεδα υγρασίας είναι υψηλά και οι θερμοκρασίες είναι μέτριες (Inacio et al. 2002). Γενικά, εμφανίζεται μια κυριαρχία του *Deuteromycetes*, κυρίως συγγενή με *Ascomycetous*. Τα πιο κοινά γένη που έχουν βρεθεί στη φυλλόσφαιρα είναι *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, και *Epicoccum*. (Levetin & Dorsey 2006).

Οι Inacio et al. (2002) μελέτησαν την πολυμορφία και την εποχιακή διακύμανση των επίφυτων *Mycobiota* στη φυλλόσφαιρα, επιλεγμένων φυτικών ειδών του Φυσικού Πάρκου Arrabida, της Πορτογαλίας, που αποτελεί ένα χαρακτηριστικό μεσογειακό οικοσύστημα. Στα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι οι πληθυσμοί των μυκήτων εγκαταστάθηκαν στην φυλλόσφαιρα των φυλλοβόλων δέντρων σε ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (από την άνοιξη μέχρι το φθινόπωρο) και ότι ο κύκλος εργασιών των φύλλων, η διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων, ή άλλοι ενδογενείς παράγοντες (π.χ., παρουσία των φυτοχημικών με αντιμικροβιακή δράση) επηρεάζουν τα επίπεδα των μυκητιακών πληθυσμών στα δέντρα.

### 1.3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση της ποικιλότητας, και της εποχιακής διακύμανσης των επίφυτων μυκήτων της φυλλόσφαιρας φυτών σε ένα Μεσογειακό οικοσύστημα. Τα φυτά των Μεσογειακών οικοσυστημάτων δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς ως φυσικοί οικότοποι για τους μικροοργανισμούς σε γενικές γραμμές, και για μύκητες ειδικότερα. Η σύσταση της επίφυτης μικροβιακής κοινότητας παρουσιάζει το ενδιαφέρον της έρευνας αυτής. Οι επίφυτοι μικροοργανισμοί, η λειτουργία και η ποικιλότητα τους, έχουν προσελκύσει την προσοχή κατά την τελευταία δεκαετία σε τομείς όπως η ιατρική, η γεωργία και η βιομηχανία, κυρίως λόγω των τεράστιων δυνατοτήτων για χρήση των ποικίλων δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν και τους ρόλους τους στην ανάπτυξη των φυτών.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από ένα Μεσογειακό οικοσύστημα στην χερσόνησο της Σιθωνίας, στην Χαλκιδική. Το συγκεκριμένο οικοσύστημα χαρακτηρίζεται από ένα μεσογειακού-τύπου κλίμα με ζεστά, ξηρά καλοκαίρια και κρύους και υγρούς χειμώνες. Η δειγματοληψία έγινε από 8 διαφορετικά ενδημικά φυτά σε τρεις θέσεις της περιοχής που παρουσιάζουν μακροσκοπικές διαφορές ως προς την βλάστηση που ευδοκμεί (Εικόνα 1). Η θέση Α παρουσίαζε πλήρη εδαφοκάλυψη από στρώσεις αείφυλλων, σκληρόφυλλων θάμνων και συλλέχθηκαν τα κυρίαρχα φυτικά είδη: *Arbutus unedo* (Εικόνα 2), *Pistacia lentiscus* (Εικόνα 3), *Quercus coccifera* (Εικόνα 4), *Myrtus communis* (Εικόνα 5), *Phillyrea angustifolia* (Εικόνα 7). Η θέση Β βρίσκεται στην απόληξη ενός ρυακιού και παρουσιάζει φυτοκάλυψη από ποώδη φυτά, από όπου συλλέχθηκαν *Melissa officinalis* (Εικόνα 8). Τέλος η θέση C παρουσιάζει φυτοκάλυψη από χαμηλού ύψους θάμνους και αποτελεί την πιο ξηρική θέση δειγματοληψίας, από όπου συλλέχθηκαν τα είδη: *Lavandula stoechas* (Εικόνα 7), *Cistus incanus* (Εικόνα 9) και αποτελεί την πιο ξηρική θέση δειγματοληψίας.



**Εικόνα 1.** Οι τρεις θέσεις απο τις οποίες συλλέχθηκαν τα δείγματα φύλλων απο το οικοσύστημα στη Σιθωνία της Χαλκιδικής.

Η δειγματοληψία έγινε σε δύο περιόδους, το καλοκαίρι (Ιούλιο) και τον χειμώνα (Ιανουάριο) του ίδιου έτους (2014). Σε κάθε ημερομηνία τα δείγματα αποτελούνταν από υγιή φύλλα, που συλλέχθηκαν τυχαία από το ίδιο άτομο κάθε είδους (από τρία άτομα ανά είδος). Φύλλα επιλέχθηκαν τυχαία από διαφορετικές περιοχές του δέντρου ή θάμνου, ώστε να αποφευχθούν πιθανά σφάλματα στις μετρήσεις λόγω τοπικών διακυμάνσεων των πληθυσμών των μυκήτων.





**Εικόνα 2.** *Arbutus unedo*.



**Εικόνα 6.** *Phillyrea angustifolia*.



**Εικόνα 3.** *Pistacia lentiscus*.



**Εικόνα 7.** *Lavandula stoechas*.



**Εικόνα 4.** *Quercus coccifera*.



**Εικόνα 8.** *Melissa officinalis*.



**Εικόνα 5.** *Myrtus communis*.



**Εικόνα 9.** *Cistus incanus*.

## 2.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΦΥΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Τα φύλλα που συλλέχθηκαν από τα 8 διαφορετικά ενδημικά φυτά μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και πραγματοποιήθηκαν με τη σειρά:

### 2.2.1 Εξαγωγή DNA

Η εξαγωγή DNA έλαβε χώρα όπως έχει περιγραφεί από τους (Moulas et al. 2013) με ελαφρές τροποποιήσεις. Εν συντομία, τα δείγματα φύλλων εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7) και έπειτα τοποθετήθηκαν σε ένα λουτρό υπερήχων για 7 λεπτά, για την αποκόλληση των μικροοργανισμών από την επιφάνεια του φύλλου. Μετά την προσεκτική απομάκρυνση των φύλλων, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1500xg στροφές στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και η μικροβιακή βιομάζα που παραλήφθηκε από το ίζημα χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή DNA με το εμπορικό kit PowerSoil® DNA isolation Kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η απόφαση χρήσης του συγκεκριμένου kit ελήφθη ύστερα από συγκριτικές δοκιμές με αντίστοιχα kit (π.χ. Tissue DNA Isolation kit και Macherey-Nagel), τα οποία έδειξαν την υπεροχή του Power Soil DNA isolation kit. Το DNA ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση φθορισμόμετρου Qubit™, της εταιρείας Invitrogen.

### 2.2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει *in vitro* νέο κλώνο DNA, συμπληρωματικό προς το εκμαγείο του υπάρχοντα κλώνου.

Για την μελέτη της μικροβιακής κοινότητας και συγκεκριμένα για τη μελέτη της κοινότητας των μυκήτων ενισχύθηκε η ITS περιοχή των μυκήτων με PCR ημiesωτερικής ένθεσης (semi-nested PCR).

Η ITS περιοχή (Internal Transcribed Spacer) αποτελεί τμήμα ριβοσωμικού DNA (rDNA) και έχει μέσο μήκος περίπου 600 ζεύγη βάσεων (bp) παρουσιάζοντας όμως πολυμορφισμό μεγέθους στα διάφορα φύλλα μυκήτων (Porter & Golding 2011). Η περιοχή ITS αποτελείται από δύο εξαιρετικά μεταβλητές περιοχές, ITS1 και ITS2, και από το εμβόλιμο, σε αυτές, γονίδιο 5.8S. Αυτό το οπερόνιο rDNA εμφανίζεται σε πολλαπλά αντίγραφα στα γονιδιώματα, παρέχοντας έτσι έως και 100 φορές περισσότερο DNA ως εκμαγείο, από το ίδιο αρχικό υλικό απ'ότι για τα γονίδια μονού αντιγράφου (Herrera et al. 2009). Τα συστατικά της μονάδας των πυρηνικών ριβοσωμικών επαναλήψεων (rDNA) είναι μακράν οι πιο συχνοί χρησιμοποιούμενοι γενετικοί δείκτες για φυλογενετική ταυτοποίηση και ταξινόμηση στελεχών, ακόμα και σε επίπεδο ειδών. Τα γονίδια rDNA είναι πολύ συντηρημένα ανάμεσα σε μεγάλες ομάδες οργανισμών, κάτι που τα καθιστά ιδανικούς στόχους για γενικούς εκκινητές PCR που στοχεύουν να ενισχύσουν ένα ευρύ φάσμα ειδών. Ωστόσο, τα ενισχυμένα θραύσματα πρέπει, επίσης, να περιέχουν αρκετή ποικιλομορφία για να είναι κατατοπιστικά στο πεδίο της φυλογένεσης. Αυτός είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο η περιοχή ITS επιλέγεται ιδίως από μυκητολόγους. Επειδή η περιοχή ITS δεν κωδικοποιεί ριβοσωμικά συστατικά, είναι εξαιρετικά μεταβλητή, κι έτσι ακόμη και στενά

συγγενικά είδη διαφέρουν στην αλληλουχία αυτή. Ταυτόχρονα, όμως, η ενδοειδική διαφοροποίηση είναι σχετικά χαμηλή (Lindahl et al. 2013).

Στην πρώτη PCR, το DNA ενισχύθηκε με χρήση των εκκινητών ITS1F (μέγεθος 22 bp) και ITS4 (μέγεθος 20 bp), που ενισχύουν την ITS περιοχή του DNA όλων των μυκήτων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, ενώ τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω αντίδραση καθώς και οι συνθήκες πραγματοποίησής της παρουσιάζονται στους Πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα.

**Πίνακας 1.** Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της ITS ριβοσωμικής περιοχής των μυκήτων.

Γονίδιο Στόχος	Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών	Άρθρο αναφοράς
ITS περιοχή μυκήτων (600-650 bp)	ITS1F	5' – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A – 3'	White et al 1990
	ITS4	5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'	

**Πίνακας 2.** Τα συστατικά της πρώτης PCR για την ενίσχυση της πλήρους ITS ριβοσωμικής περιοχής των μυκήτων.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	2,5 µl	1x
dNTPs (10mM each)	0,5 µl	0,2 µM each
Forward primer ITS1F (20pmol/µl)	0,5 µl	0,4 µM
Reverse primer ITS4 (20pmol/µl)	0,5 µl	0,4 µM
KapaTaq Polymerase (1U/ µl)	0,1 µl	1 Unit
BSA (10µg/µl)	0,5 µl	400 µM
DNA	1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	19,4 µl	
Συνολικός όγκος	25 µl	

**Πίνακας 3.** Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες για την πρώτη PCR, όπου χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών ITS1F/ITS4(Rousidou et al. 2010).

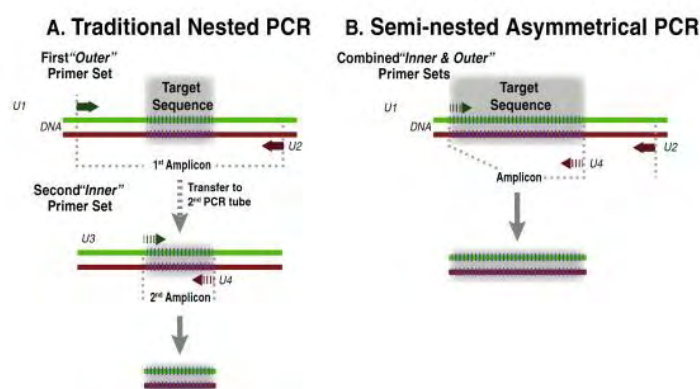
Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης			
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη	95°C	30 sec	35 cycles
Υβριδοποίηση	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	40 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

Στην πρώτη PCR χρησιμοποιήθηκε bovine serum albumin (BSA), της εταιρείας New England BioLabs®, σε τελική συγκέντρωση 400 µg/mL, με σκοπό να αποτραπεί η αναστολή της



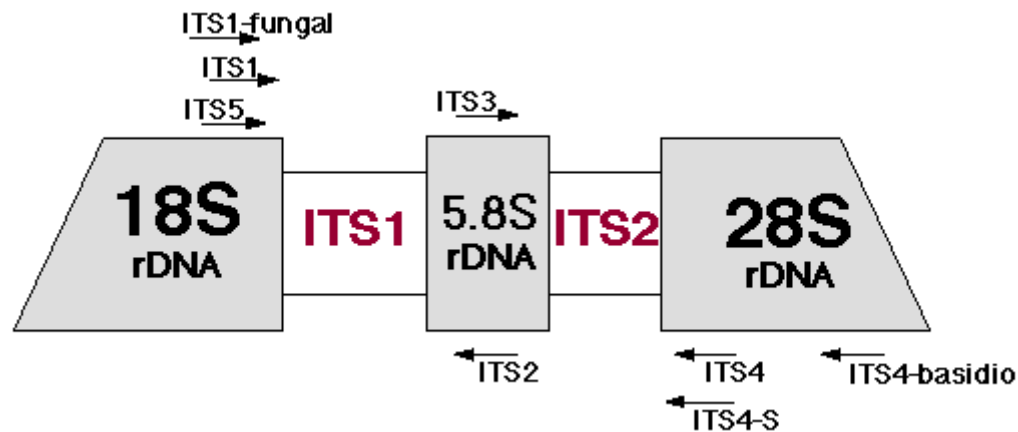
δράσης της πολυμεράσης εξαιτίας πιθανών αναστολέων που βρίσκονται στο περιβαλλοντικό DNA.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε PCR ημιεσωτερικής ένθεσης (semi-nested PCR), κατά την οποία χρησιμοποιούμε το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR ως μήτρα για την δεύτερη. Στην δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιείται νέο ζεύγος εκκινητών, ο ένας εκ των οποίων είναι ίδιος με έναν από τους δύο εκκινητές της πρώτης αντίδρασης PCR και ο άλλος είναι συμπληρωματικός προς την αλληλουχία που βρίσκεται εσωτερικά του πρώτου ζεύγους εκκινητών. Είναι ελάχιστες οι πιθανότητες συμπληρωματικότητας των εκκινητών αυτών σε μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των προϊόντων της πρώτης PCR κι έτσι εξασφαλίζεται η καθαρότητα των προϊόντων της δεύτερης PCR. Στην δεύτερη αντίδραση (nested PCR) χρησιμοποιείται νέο ζεύγος εκκινητών, οι οποίοι προσκολούνται ο ένας στο εσωτερικό της αλληλουχίας, ενώ ο άλλος εφαρμόζεται στο ένα άκρο προσθέτοντας την ουρά με την απαραίτητη συμπληρωματική αλληλουχία των GC, ώστε να ακολουθήσει η ανάλυση με τη μέθοδο DGGE.



**Εικόνα 10.** Σχηματική απεικόνιση των nested PCR και semi-nested PCR. U1/U2: Εξωτερικό ζεύγος εκκινητών της πρώτης αντίδρασης PCR. U3/U4 Εσωτερικό ζεύγος εκκινητών της δεύτερης αντίδρασης PCR. (SergeY Ongagna-Yhombietal., 2013).

Συγκεκριμένα, στη δεύτερη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F-GC και ITS2, οι οποίοι ενισχύουν ένα τμήμα μήκους περίπου 300 bp που περιλαμβάνει την ITS1 περιοχή. Ο εκκινητής ITS1F-GC που χρησιμοποιήθηκε, φέρει στο 5' άκρο του μια αλληλουχία 40 νουκλεοτιδίων πλούσια σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC-ουρά). Έτσι τα προϊόντα της δεύτερης αντίδρασης PCR φέρουν μια GC-ουρά, η οποία είναι απαραίτητη ώστε να αποφευχθεί η ολική αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων DNA κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE).



**Εικόνα 11.** Σχηματική απεικόνιση του ριβωσωμικού DNA των μυκήτων και των θέσεων υβριδισμού ορισμένων εκκινητών που χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση της ITS περιοχής των μυκήτων.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, ενώ τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR ημεισωτερικής ένθεσης καθώς και οι συνθήκες πραγματοποίησής της παρουσιάζονται στους Πίνακες 5 και 6 αντίστοιχα.

**Πίνακας 4.** Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της ITS1 ριβωσωμικής περιοχής των μυκήτων.

Γονίδιο Στόχος	Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών	Άρθρο αναφοράς
ITS1 περιοχή μυκήτων (300-350 bp)	ITS1F-GC	5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA – 3'	White et al 1990
	ITS2	5' – GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC – 3'	

**Πίνακας 5.** Τα συστατικά της PCR ημεισωτερικής ένθεσης για την ενίσχυση της ITS1 ριβωσωμικής περιοχής των μυκήτων.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	2,5 µl	1x
dNTPs (10mM each)	0,5 µl	0,2 µM each
Forward primer ITS1F-GC (20pmol/µl)	0,5 µl	0,4 µM
Reverse primer ITS2 (20pmol/µl)	0,5 µl	0,4 µM
KapaTaq Polymerase (1U/ µl)	0,1 µl	1 Unit
DNA	1 µl	
ddH <sub>2</sub> O	20,9 µl	
Συνολικός όγκος	25 µl	

**Πίνακας 6.** Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της PCR ημεισωτερικής ένθεσης, όπου χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών ITS1F-GC/ITS2 (Rousidou et al. 2010).

Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης			
Αρχική αποδιάταξη	95°C	5 min	
Αποδιάταξη	95°C	30 sec	30 cycles
Υβριδοποίηση	55°C	30 sec	
Επιμήκυνση	72°C	20 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10 min	

### 2.2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για διαχωρισμό και ανάλυση πρωτεϊνών και μικρών μορίων DNA και RNA με βάση το μέγεθος και το φορτίο τους.

Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα προϊόντα των PCR για έλεγχο ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος DNA. Χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 1% και φορτώθηκαν 5μl από κάθε δείγμα με 1μl loading buffer 6x. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στην ηλεκτροφόρηση, για να παρέχει τα απαραίτητα ιόντα ώστε να εξασφαλίζεται η μεταφορά ρεύματος και η διατήρηση του pH σε σχετικά σταθερή τιμή, ήταν το TAE (Tris/Acetate/EDTA). Η τάση που εφαρμόστηκε στους δύο πόλους ήταν 100V.

### 2.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Η DGGE ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα INGENYphorU-2x2 (Ingeny international BV, Ολλανδία).



**Εικόνα 12.** Σύστημα INGENYphorU-2x2.

Χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% και ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x. Σε κάθε "διαδρομή" φορτώθηκαν 2μl προϊόντος της semi-nested PCR, που διαθέτουν ουρά-GC. Για την ηλεκτροφόρηση και ανάλυση της κοινότητας των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30% - 55% (Ο αποδιατακτικός παράγοντας 100%

περιέχει 7M ουρία και 40% φορμαμίδη). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 75 V, για 16 ώρες, στους 60°C.

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε βαφή της πηκτής με νιτρικό άργυρο όπως περιγράφεται από τους McCaig et al. 2001. Η εικόνα της πηκτής μετά την βαφή φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική και ακολούθησε ανάλυση των εικόνων των πηκτωμάτων DGGE με το λογισμικό CrossCheker. Τα μοριακά αποτυπώματα μετατράπηκαν, μέσω καταμέτρησης για την παρουσία και την απουσία ζωνών, σε δεδομένα δυαδικής μορφής (Binary data), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την στατιστική ανάλυση με μεθόδους πολυμεταβλητότητας με ανάλυση κατά συστάδες (cluster analysis) με την μέθοδο *Jaccard distance matri* χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο *group average* (Karpouzas et al. 2014). Η ανάλυση των δεδομένων με μεθόδους πολυμεταβλητότητας πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics 20.

### 2.2.5. Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR και αλληλούχιση

Τα προϊόντα της πρώτης PCR καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το εμπορικό Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany) και κλωνοποιήθηκαν με τη διαδικασία της ένθεσης χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit της εταιρείας PROMEGA, p-GEM® και επακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας. Βάση του τύπου: 
$$\frac{25ngvectcor \times 0,6 kbinsert}{3,015 kb} \times \frac{3}{1}$$
 υπολογίστηκαν τα μl DNA κάθε δείγματος που έπρεπε να χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση ένθεσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Τα αντιδραστήρια και οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Έπειτα από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C για 16 ώρες.

**Πίνακας 7.** Συστατικά της ένθεσης των προϊόντων PCR σε πλασμιδιακό φορέα pGEM-T.

Αντιδραστήρια	Όγκοι
Buffer 10x	1 μl
pGEM-T	0,5 μl
Insert	
T <sub>4</sub> ligase	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	
Total	10 μl

Έπειτα μετασχηματίστηκαν δεκτικά κύτταρα E.coli DH5a. Σε 80 μl δεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 2μl από το μίγμα της ένθεσης και ακολούθησε διαδικασία heat-shock για εισαγωγή του μετασχηματισμένου πλασμιδίου στα κύτταρα. Προστέθηκαν 500 μl υγρό θρεπτικό υλικό (LB) και επωάστηκαν στους 37°C για 90 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα απλώθηκαν σε τριβλία με στερεό θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε αμικικιλίνη (100mg/ml), X-GAL (2%) και IPTG (0,1 M) και επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες. Η επιλογή των αποικιών έγινε με βάση το χρώμα τους. Η διάσπαση του X-GAL από το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση αποδίδει μπλε χρώμα στην αποικία βακτηρίων χωρίς ένθεμα στο

πλασμίδιο. Εάν έχει γίνει η ένθεση στο πλασμίδιο δεν παράγεται β-γαλακτοσιδάση και το χρώμα των αποικιών είναι λευκό, οι οποίες και επιλέχθηκαν. Γενικά επιλέχθηκαν 25 κλώνοι από κάθε δείγμα με χρήση αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων ακίδων τοποθετήθηκαν οι κλώνοι σε LB με αμπικιλίνη και αποθηκεύτηκαν σε γλυκερόλη 30% στους -80°C.

Έπειτα δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη κλώνων για κάθε δείγμα που μελετήθηκε σύμφωνα με τους Liang et al (2008). Εν συντομία, οι κλώνοι που επιλέχθηκαν από κάθε δείγμα ελέγχθηκαν με colony-PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ημiesωτερικής ένθεσης ITS1F-GC και ITS2 και τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν, ώστε να διαπιστωθεί εάν περιέχουν το σωστό ένθεμα. Εν συνεχεία, το προϊόν PCR των κλώνων που περιείχαν το σωστό ένθεμα αξιολογήθηκαν ως προς την κινητικότητα τους σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουιών (DGGE) σε αντιπαραβολή με τα περιβαλλοντικά δείγματα από τα οποία προήλθαν.

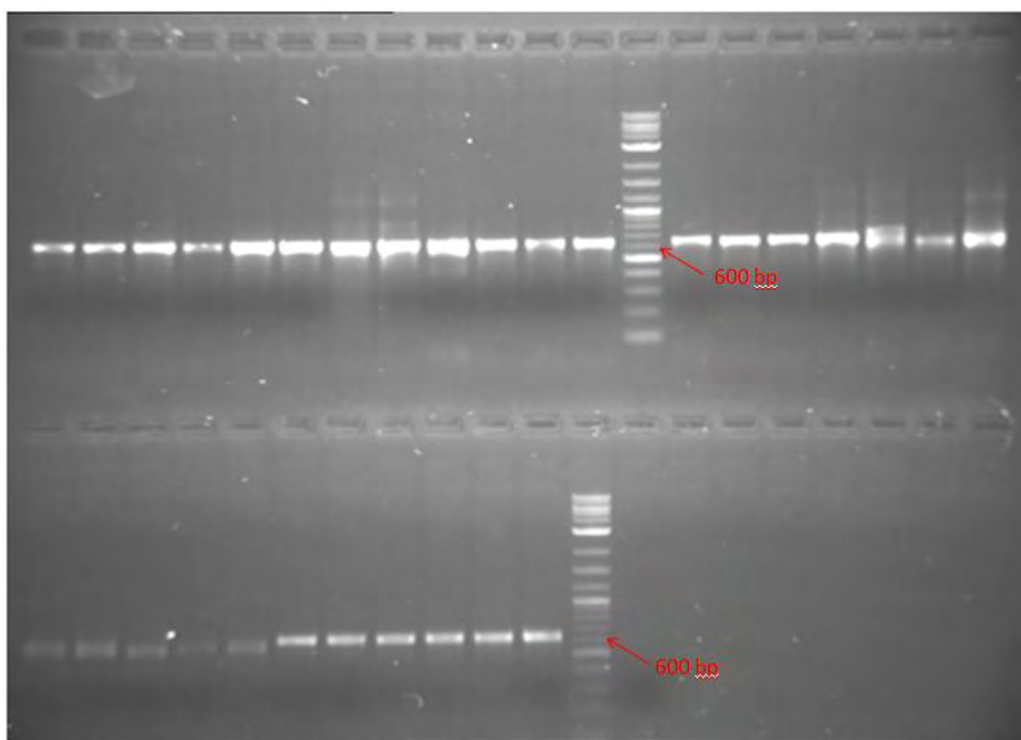
Αντιπροσωπευτικοί κλώνοι που εμφάνισαν πανομοιότυπη κινητικότητα σε σχέση με ζώνες των περιβαλλοντικών δειγμάτων επιλέχθηκαν για αλληλούχιση. Επιλέχθηκαν συνολικά 72 κλώνοι και πραγματοποιήθηκε η αλληλούχισή τους. Προκειμένου να γίνει η αλληλούχιση, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA από τους 80 κλώνους, που αποθηκεύτηκαν με γλυκερόλη στους -80°C, χρησιμοποιώντας το εμπορικό ISOLATEII Plasmid Mini kit (Bioline) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ακολούθως τα πλασμίδια απεστάλησαν στην εταιρία CEMIA για ανάλυση της αλληλουχίας του ενθέματος.

Για την ταυτοποίηση των κλώνων που αλληλουχήθηκαν πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση της αλληλουχίας της ITS ριβοσωμικής περιοχής με τις καταχωρημένες αλληλουχίες της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) του NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

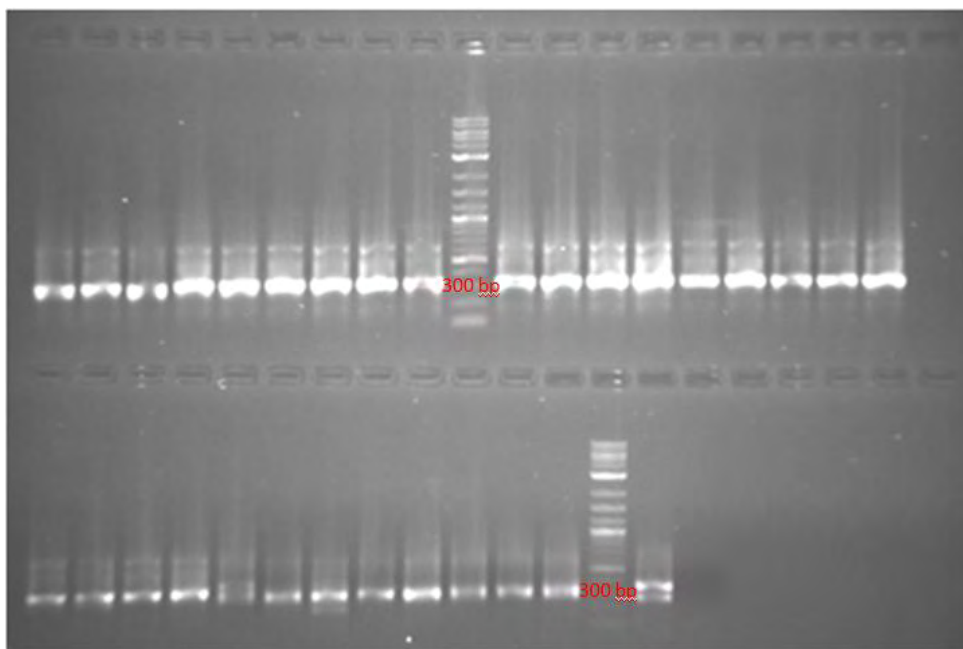
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Στην πρώτη αντίδραση PCR για τους μύκητες χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1F και ITS4 που ενισχύουν ένα τμήμα μήκους ~600bp της ITS περιοχής του ριβοσωμικού DNA των μυκήτων (ΕΙΚΟΝΑ 13). Έπειτα το προϊόν αυτής της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για PCR ημiesωτερικής ένθεσης με τους εκκινητές ITS1F-GC και ITS2 που ενισχύουν ένα τμήμα μήκους ~300bp, το οποίο προϊόν είναι κατάλληλο για ανάλυση με μέθοδο DGGE (ΕΙΚΟΝΑ 14).



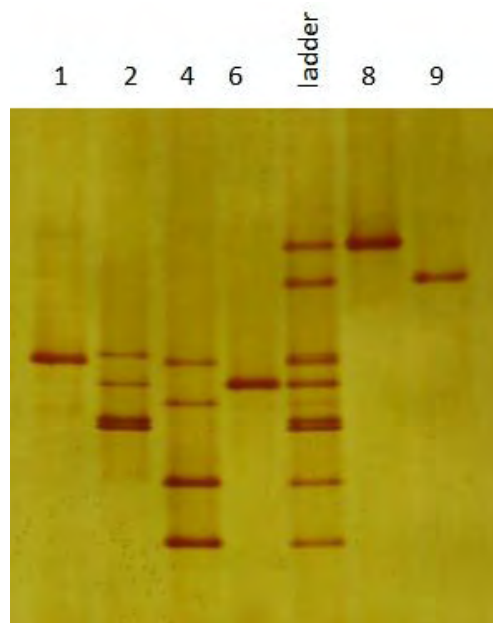
**Εικόνα 13.** Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR σε πηκτή αгарόζης 1%, που προέκυψαν από την ενίσχυση της ITS περιοχής του ριβοσωμικού DNA των μυκήτων με τους εκκινητές ITS1F και ITS4. Ως ladder χρησιμοποιήθηκε το Quick-Load® 2-Log DNA Ladder(0.1-10.0 kb), της εταιρείας NewEngland Biolabs®. Στα πηγαδάκια φορτώθηκαν 5 μl προϊόντος PCR.



**Εικόνα 14.** Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR ημiesωτερικής ένθεσης σε πηκτή αραρόζης 1%, που προέκυψαν απο την ενίσχυση της ITS1 περιοχής του ριβοσωμικού DNA των μυκήτων με τους εκκινητές ITS1F-GC και ITS2. Ως ladder χρησιμοποιήθηκε το Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb), της εταιρείας NewEnglandBiolabs®. Στα πηγαδάκια φορτώθηκαν 5μl προϊόντος PCR ημiesωτερικής ένθεσης.

### 3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή με βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών (DGGE)

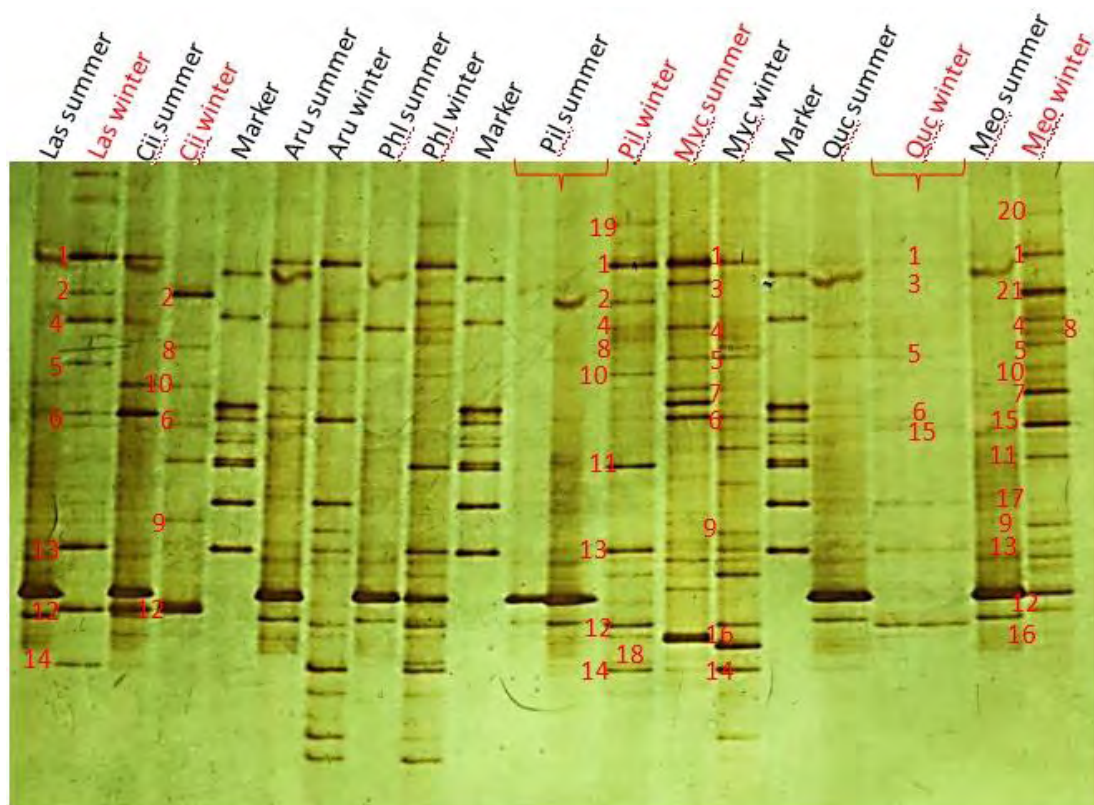
Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 8 ηλεκτροφορήσεις DGGE ανάλυσης με 2 μl LADDER που προήλθε από ανάμιξη προϊόντων PCR της ITS1 περιοχής των μυκήτων *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma sp.*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL), *Fusarium solani* (FSK). Για την παραγωγή του LADDER προστέθηκαν 1μl από κάθε καλλιέργεια μύκητα σε 2,5 μl mix, η ανάλυση του οποίου φαίνεται στην Εικόνα 15.



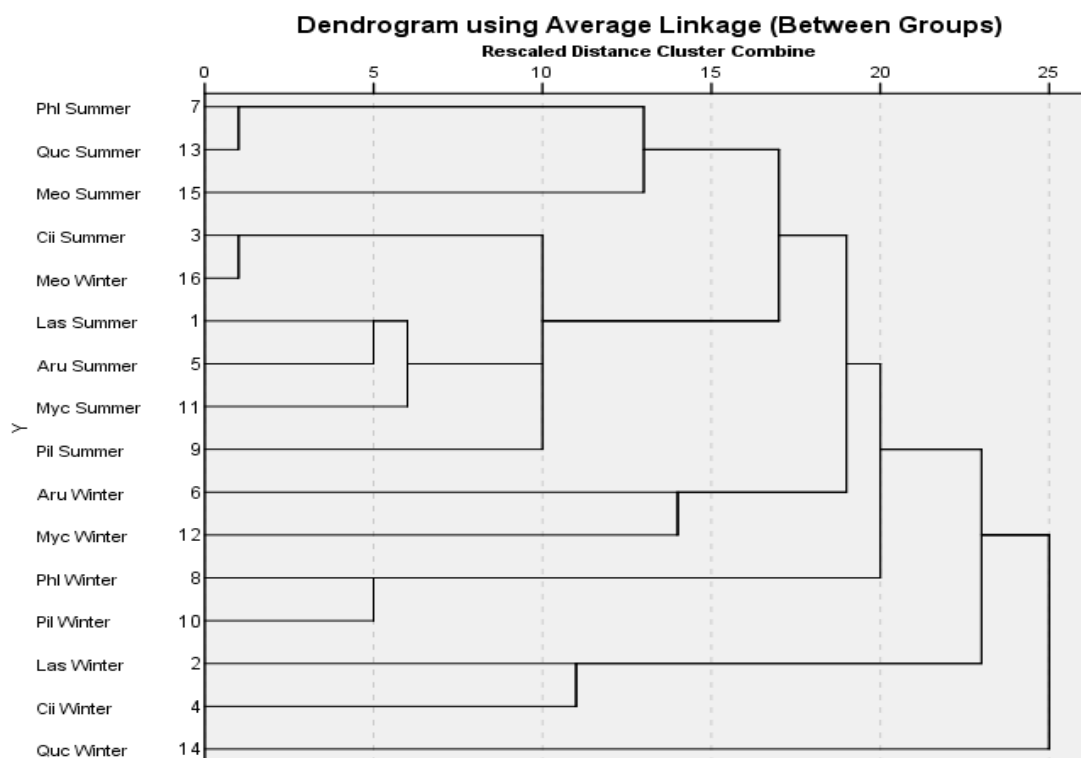
**Εικόνα 15.** Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου αναλύθηκε ο LADDER και φαίνεται ο διαχωρισμός των μυκήτων, ΓΡΑΜΜΗ 1.*Trametes versicolor*, ΓΡΑΜΜΗ 2.*Pleurotus ostreatus*, ΓΡΑΜΜΗ 4. *Phanerochaete chrysosporium*, ΓΡΑΜΜΗ 6.*Trichoderma* sp., ΓΡΑΜΜΗ 8.FORL, ΓΡΑΜΜΗ 9.FSK

Η αξιολόγηση των ζωνών των περιβαλλοντικών δειγμάτων έγινε με ένα κοινό σύστημα αρίθμησης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 16. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση DGGE και των τριών επαναλήψεων όλων των φυτών και περιόδων ώστε να διαπιστωθεί η παραλλακτικότητα μεταξύ του αποτυπώματος της κοινότητας των μυκήτων στις επαναλήψεις μεταξύ δειγμάτων από το ίδιο φυτό και περίοδο. Γενικότερα διαπιστώθηκε ότι οι επαναλήψεις μεταξύ τους εμφάνιζαν περιορισμένη παραλλακτικότητα και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε να αναμιχθούν ώστε να τρέξουμε ένα δείγμα ανα φυτό-περίοδο σε μια ηλεκτροφόρηση για να καταστεί δυνατή και η σύγκριση μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων. Από μια επισκόπηση των μοριακών αποτυπωμάτων που παραλήφθηκαν μια πρώτη παρατήρηση είναι ότι στα περισσότερα φυτά ανεξάρτητα περιόδου δειγματοληψίας καταγράφεται μια πλούσια μυκητιακή κοινότητα (Εικόνα 16) με μοναδική εξαίρεση τα φυτά Pil της καλοκαιρινής περιόδου και Quc της χειμερινής περιόδου. Για να αξιολογήσουμε την επίδραση των παραγόντων φυτό και περίοδος στην δομή της κοινότητας των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση κατά συστάδες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο δενδρόγραμμα της Εικόνας 17. Από την στατιστική ανάλυση διακρίνεται μία ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση την εποχή δειγματοληψίας. Μόνη εξαίρεση αποτελεί το δείγμα *Melissa officinalis* (Meo), όπου φαίνεται ότι η εναλλαγή των εποχών δεν επηρεάζει σημαντικά τη σύσταση της κοινότητας των μυκήτων στη φυλλόσφαιρα.



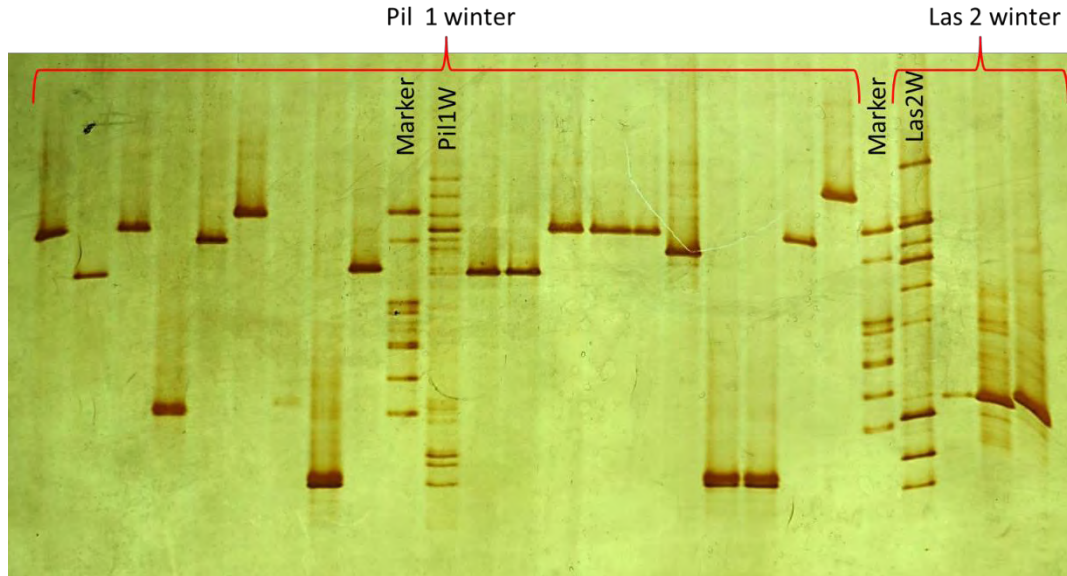


**Εικόνα 16.** Εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55%. Τα περιβαλλοντικά δείγματα που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα, όπου *Las*: *Lavandula stoecha*, *Cii*: *Cistus incanus*, *Pil*: *Pistacia lentiscus*, *Myc*: *Myrtus communis*, *Quc*: *Quercus coccifera*, *Meo*: *Melissa officinalis*. Όπου Marker αναφέρεται στο ladder που αναφέρεται στην Εικόνα 15. Η ενιαία αρίθμηση των ζωνών που φαίνεται σε επιλεγμένες γραμμές αντιστοιχεί στην αρίθμηση των κλώνων στις βιβλιοθήκες κλώνων που δημιουργήθηκαν για τα συγκεκριμένα δείγματα.



**Εικόνα 17.** Ανάλυση κατά συστάδες της κοινότητας των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα των διαφόρων φυτών κατά την θερινή (summer) ή χειμερινή (winter) περίοδο όπως αυτή αποτυπώθηκε στη πηκτή DGGE (Εικόνα 16).

Ακολουθώντας για την ταυτοποίηση των κυριότερων μελών της μυκητιακής κοινότητας στα διάφορα φυτά που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκαν βιβλιοθήκες κλώνων για επιλεγμένα δείγματα (αυτά που εμφάνιζαν την μεγαλύτερη ποικιλότητα ζωνών). Η αντιστοίχιση των κλώνων στις ζώνες του μοριακού αποτυπώματος κάθε δείγματος έγινε όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2. Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτική εικόνα πηκτής DGGE της βιβλιοθήκης κλώνων (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18.** Ενδεικτική εικόνα πηκτής DGGE σε βαθμίδωση αποδιατακτικών ουσιών 30-55% όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κλώνων της βιβλιοθήκης ITS.

Τα αποτελέσματα από τις βιβλιοθήκες κλώνων αφού παραλήφθησαν ακολούθησε ανάλυση τους χρησιμοποιώντας το εργαλείο BlastN και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 8.** Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των αλληλουχιών που προέκυψαν από τις βιβλιοθήκες κλώνων που ετοιμάστηκαν για τα διάφορα δείγματα. Για κάθε ζώνη, όπως αυτή εντοπίστηκε στο μοριακό αποτύπωμα των διαφόρων δειγμάτων παρατίθενται τα αποτελέσματα για κάθε κλώνο σχετιζόμενο με τη συγκεκριμένη ζώνη. Η κωδικοποίηση του κάθε κλώνου στην στήλη δείγμα έχει ως εξής Pil (φυτό), W (Περίοδος W ή S) και 18 (αριθμός κλώνου που αλληλουχήθηκε)

Αριθμός Ζώνης	Δείγμα	Αλληλουχία με το υψηλότερο ποσοστό συμφωνίας	Συμφωνία Αλληλουχιών bp (%)
1	PilW_18	<i>Cladosporium perangustum</i> strain DTO 220-D5	506/551(92%)
	PilW_1	<i>Peltaster</i> sp. P8 strain KY3_8E1a	396/450(88%)
	PilW_20	<i>Botrytis cinerea</i> isolate KP10060	535/535(100%)
	PilW_9	<i>Peltaster</i> sp. P8 strain KY3_8E1a	396/450(88%)
	PilW_11	<i>Peltaster</i> sp. P8 strain KY3_8E1a	396/450(88%)
2	PilW_1	<i>Ceramothyrium carniolicum</i> strain CBS 175.95	566/596(95%)
	PilW_3	<i>Ceramothyrium carniolicum</i> strain CBS 175.95	566/596(95%)
	Pil1W_12	<i>Trichomerium foliicola</i> strain MFLUCC10-0078	638/680(94%)
	PilW_13	<i>Ceramothyrium carniolicum</i> strain CBS 175.95	566/596(95%)
	PilW_14	<i>Ceramothyrium carniolicum</i> strain CBS 175.95	566/596(95%)

	PilW_19	<i>Ceramothyrium carniolicum</i> strain CBS 175.95	566/596(95%)
3	PilW_6	<i>Cladosporium subuliforme</i>	547/547(100%)
	MycS_10	<i>Cladosporium ramotenellum</i> strain DTO 255-G5	545/545(100%)
	CiiW_25	<i>Botryosphaeriales</i> sp. 2 IP-2014 strain NY410	396/400(99%)
	MycS_9	<i>Cladosporium ramotenellum</i> strain DTO 255-G5	545/545(100%)
	MeoW_13	<i>Pestalotiopsis chamaeropsis</i>	598/600(99%)
	MeoW_21	<i>Symmetrospora gracilis</i>	580/595(97%)
4	PilW_5	<i>Trichomerium foliicola</i> strain MFLUCC10-0058	636/678(94%)
	PilW_15	<i>Trichomerium foliicola</i> strain MFLUCC10-0078	643/677(95%)
	MeoW_2	<i>Vishniacozyma carnescens</i> culture-collection CBS:8407	516/518(99%)
	MeoW_20	Uncultured <i>Pezizomycotina</i> clone L10	491/541(91%)
	MeoW_18	<i>Cladosporium cladosporioides</i> strain J-1-2	546/547(99%)
5	MeoW_17	Uncultured fungus clone 2170_275	331/334(99%)
	MeoW_3	<i>Golubevia pallescens</i> strain G336	669/677(99%)
6	Meo3W_4	Uncultured fungus clone MOTU_55_GYUGVSB04IL594	289/290(99%)
	CiiW_1	<i>Serpula himantoides</i> MUCL:30528	646/646(100%)
	Meo5W_27	<i>Tremellaceae</i> sp. TMS-2011 voucher SC13d50p14-5	274/351(78%)
7	Pil3W_15	<i>Pezizales</i> sp. ICMP 20644	418/446 (94%)
	MeoW_5	<i>Cryptococcus nemorosus</i> ITS1	529/558(95%)
	MeoW_7	<i>Cryptococcus nemorosus</i> ITS1	529/558(95%)
	MeoW_11	<i>Cryptococcus nemorosus</i> ITS1	529/558(95%)
	MeoW_18	<i>Neoplatysporoides aloicola</i> strain CPC 24435	476/476(100%)
8	MeoW_19	<i>Pestalotiopsis chamaeropsis</i>	589/601(98%)
	Pil3W_8	Uncultured fungus clone CMH211	568/578(98%)
	MeoW_8	<i>Toxicocladosporium banksiae</i> culture-collection CBS:128215	530/548(97%)
9	Pil1W_7	<i>Antennariella placitae</i> strain E337	493/549(90%)
	MeoW_12	<i>Malassezia sympodialis</i> culture-collection CBS:7977	639/640(99%)

	Pil1W_4	<i>Epicoccum nigrum</i> isolate 63Ja14	366/377(97%)
	LasW_31	<i>Tremellaceae</i> sp. TMS-2011 voucher SC13d50p14-5	499/501(99%)
	LasW_32	<i>Rachicladosporium americanum</i> culture-collection CBS:124774	532/563(94%)
10	Meo3W_16	Uncultured <i>Pezizomycotina</i> clone L10	492/541(91%)
	MeoW_12	<i>Malassezia sympodialis</i> culture-collection CBS:7977	639/640(99%)
	PilW_9	<i>Trichomerium foliicola</i> strain MFLUCC10-0058	362/369(98%)
	PilW_11	<i>Ceramothyrium carniolicum</i> strain CBS 175.95	565/596(95%)
	Meo2W_23	<i>Tremellales</i> sp. QMW-2009d strain AS 2.4163	439/522(84%)
	PilW_10	<i>Trimmatostroma cordae</i>	594/605(98%)
11	MeoW_1	<i>Pezizella discreta</i> voucher 7511	520/551(94%)
12	MeoW_3	<i>Rachicladosporium pini</i> culture-collection CPC:16770	532/573(93%)
	CiiW_22	Uncultured fungus clone L049695B01	510/545(94%)
	CiiW_23	Uncultured fungus clone L049695B01	497/545(91%)
	CiiW_21	Uncultured fungus clone L049695B01	509/545(93%)
	CiiW_26	Uncultured fungus clone L049695B01	509/545(93%)
	MeoW_10	<i>Epicoccum nigrum</i> isolate E20	539/540(99%)
	MeoW_15	<i>Teratosphaeria cf. bellula</i> CPC 18280	491/547(90%)
	PilW_2	Uncultured <i>Fibulobasidium</i> clone AEW4_77	473/542(87%)
	MeoW_25	<i>Rachicladosporium pini</i> culture-collection CPC:16770	533/573(93%)
13	MeoW_14	<i>Rachicladosporium pini</i> culture-collection CPC:	533/573(93%)
	PilW_6	Uncultured <i>Pseudocercospora</i> clone AEW4_89	520/536(97%)
	PilW_10	Uncultured <i>Pseudocercospora</i> clone AEW4_89	520/536(97%)
	PilW_13	Uncultured <i>Pseudocercospora</i> clone AEW4_89	520/536(97%)
	PilW_20	Uncultured <i>Pseudocercospora</i> clone AEW4_89	520/536(97%)
14	PilW_8	<i>Microcyclospora tardicrescens</i> isolate T13F2b	507/552(92%)

	PilW_17	<i>Microcyclospora tardicrescens</i> isolate T13F2b	507/552(92%)
	Pil1W_18	Uncultured fungus clone B4_872	491/559(88%)
15	PilW_14	<i>Scoliciosporum umbrinum</i> isolate LIFU100-16	597/598(99%)
	MeoW_20	<i>Serpula himantioides</i> MUCL:30528	646/646(100%)
	MeoW_7	<i>Pleospora fallens</i> culture-collection ICMP:10936	503/522(96%)
	MeoW_6	<i>Pleospora fallens</i> culture-collection ICMP:10936	503/522(96%)
18	PilW_3	<i>Microcyclospora tardicrescens</i> isolate T13F2b	508/552(92%)
19	PilW_16	<i>Botrytis cinerea</i> isolate KP10060	534/535(99%)
20	MeoW_1	<i>Eurotiomycetes</i> sp. voucher ARIZ:BC0196	465/473(98%)
21	MeoW_19	<i>Cladophialophora scillae</i> strain CBS 116461	511/556(92%)

Η πλειοψηφία των μυκήτων που βρέθηκαν στην φυλλόσφαιρα των φυτών ανήκουν στους Ασκομύκητες. Μεταξύ αυτών οι πιο συχνά απαντώμενοι μύκητες στην φυλλόσφαιρα των φυτών ανήκουν στα γένη *Cladosporium* και σε συγγενή γένη όπως *Toxicocladosporium* και *Rachicladosporium*. Επίσης, με μικρότερη συχνότητα απαντώνται μύκητες της τάξης *Helotiales*. Εκτός των Ασκομυκήτων εντοπίστηκαν συχνά και ζυμομύκητες που ανήκουν στα γένη *Tilletiopsis*, *Symmetrospora*, *Cryptococcus* και το συγγενές γένος *Vishniacozyma*.

Γενικότερα στα μοριακά αποτύπωματα παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλοότητα και δεν καταγράφηκαν ζώνες που ήταν παρούσες σε όλα τα δείγματα ή αντίστοιχα ζώνες που εμφανίζουν περιοδικότητα ή εκλεκτικότητα ως προς κάποιο φυτό. Από τις πιο συχνά απαντώμενες ζώνες στα μοριακά αποτυπώματα των διαφόρων φυτών στις δύο εποχές δειγματοληψίας ήταν η ζώνη 1 που βρέθηκε ότι αντιπροσωπεύει μύκητες που ανήκουν στο γένος *Cladosporium* και στο είδος *Botrytis cinerea*. Αντίστοιχα, η ζώνη 12 φαίνεται ότι αντιπροσωπεύει μύκητες του είδους *Epicoccum nigrum* αλλά και διάφορους άλλους Ασκομύκητες που το ποσοστό ομολογίας των αλληλουχιών των κλώνων δεν επιτρέπει την κατάταξη τους σε γένος ή είδος. Επίσης, άλλες συχνά απαντώμενες ζώνες είναι η ζώνη 13 και η ζώνη 7, που φαίνεται να αντιπροσωπεύουν Ασκομύκητες του γένους *Pseudocercospora* και το είδος *Neoplatisporoides aloicola* αντίστοιχα, καθώς και η ζώνη 6 και η ζώνη 10 που αντιπροσωπεύουν Βασιδιομύκητες των ειδών *Serpula himantioides* και *Malassezia sympodialis* (Πίνακας 8).

## 4. Συζήτηση

### 4.1. Η επίδραση του φυτού και της περιόδου στην δομή της κοινότητας των επίφυτων μυκήτων

Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση (Εικόνα 17) υπάρχει εμφανής ομαδοποίηση των δειγμάτων μεταξύ χειμερινής και καλοκαιρινής περιόδου. Από την βιβλιογραφία ξέρουμε, ότι οι εναλλαγές στην εποχικότητα επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την μικροβιολογία της φυλλόσφαιρας, κάτι που διαπιστώνεται από την στατιστική ανάλυση της έρευνας αυτής. (He et al. 2012, Jumpponen & Jones 2010, Thompson et al. 1993, Ercolani 1991). Ωστόσο, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να προσαρμόζονται στις μεγάλες διακυμάνσεις των θερμοκρασιών που εκτίθενται, ζώντας σε ένα Μεσογειακό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, μια εξαίρεση εμφανίζεται όσον αφορά τα χειμερινά δείγματα του φυτού *Melissa officinalis* τα οποία τοποθετούνται πιο κοντά με δείγματα της καλοκαιρινής περιόδου. Φαίνεται ότι δεν υπάρχει σημαντική παραλλαγή μεταξύ των μικροοργανισμών που αποικίζουν τα φυτά *Melissa officinalis* των δύο περιόδων. Το γεγονός μπορεί να σχετίζεται με τη δομή του φύλλου του αρωματικού φυτού *Melissa officinalis* (Vokou et al. 2012) και αξίζει να ερευνηθεί περαιτέρω. Εκτός του τελευταίου, δεν εμφανίζεται ειδικότητα των μικροοργανισμών ως προς κάποιο φυτό οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η επίδραση του φυτού στη δομή της κοινότητας των μικροοργανισμών πιθανόν να είναι ελάχιστη έως μηδαμινή.

Οι He et al. (2012) έδειξαν ότι τα γένη *Cladosporium* και *Cryptococcus* ήταν οι κυρίαρχοι επιφυτικοί μύκητες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες σε οπωρώνες. Το εποχικό πρότυπο των αερομεταφερόμενων σπορίων *Cladosporium* στις βόρειες εύκρατες περιοχές περιλαμβάνει συγκεντρώσεις οι οποίες είναι χαμηλές κατά τη διάρκεια του χειμώνα και αυξάνονται στο μέγιστο κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Το ίδιο πρότυπο παρατηρείται και σε άλλους επιφυτικούς σαπροφυτικούς μύκητες οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις κατά το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, όταν η μέγιστη επιφάνεια του κατάλληλου ξενιστή είναι διαθέσιμη για ανάπτυξη και δημιουργία αποικιών (Marshall 1997).

Επίσης, μύκητες που ανήκουν στα γένη *Cladosporium*, *Alternaria*, *Cryptococcus* και *Sporobolomyces* εμφανίζουν ανθεκτικότητα κατά την καλλιεργητική περίοδο λόγω της άριστης προσαρμογής τους στη φυλλόσφαιρα. Συγκεκριμένα, ο αριθμός αυτών των μυκήτων εμφάνισε μέγιστο στα μέσα της περιόδου, κατά τη διάρκεια της θερμότερης και ξηρότερης περιόδου (Thompson et al. 1993).

Ωστόσο, οι Jumpponen & Jones (2010) έδειξαν ότι η μυκητιακή κοινότητα είναι εποχικά δυναμική σε φυλλοβόλα δέντρα και θεωρούν ότι αυτές οι εποχιακές αλλαγές οφείλονται κυρίως στην πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια διασπορά ή / και τις περιβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν την μεγάλη ποσότητα παραγωγής ή την διασπορά.

Επίσης, σε μελέτη του Ercolani (1991) βρέθηκε ότι η σχετική υγρασία, ως μετεωρολογική παράμετρος, είναι αυτή που επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την ατμοσφαιρική συγκέντρωση των σπορίων (ευνοούν την απελευθέρωση των βασιδιοσπορίων και των ασκοσπορίων), κυρίως κατά τη διάρκεια της εποχής των βροχών, καθώς επίσης και οι



άνεμοι που αυξάνουν τη συγκέντρωση σπορίων στον αέρα και δρουν ως μηχανισμοί διασποράς.

Στην έρευνα των Penuelas et al. (2012) σε ένα κυρίαρχο είδος δένδρου των μεσογειακών δασών, του *Quercus ilex*, φαίνεται ότι η εποχικότητα επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αφθονία και την ποικιλομορφία των μικροβιακών κοινοτήτων της φυλλόσφαιρας, συγκεκριμένα η κοινότητα των επίφυτων μυκήτων στην επιφάνεια των φύλλων μειώθηκε από την υγρή περίοδο της άνοιξης προς την ξηρή περίοδο του καλοκαιριού, ενώ συγχρόνως αυξήθηκε η ενδοφυτική κοινότητα των μυκήτων.

## 4.2. Ποικιλότητα των επίφυτων μυκήτων στη φυλλόσφαιρα όπως καταγράφηκε με την μέθοδο DGGE και βιβλιοθήκες κλώνων

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης των κλώνων (Πίνακας 8), παρατηρείται ένα μεγάλο ποσοστό των μυκήτων που αποικίζουν την φυλλόσφαιρα των συγκεκριμένων φυτών ανήκουν στο Φύλο των Ασκομυκήτων. Οι ασκομύκητες είναι ένα από τα κυριότερα Φύλα του βασιλείου των μυκήτων, μαζί με τους Βασιδιομύκητες. Αποτελεί τη μεγαλύτερη συνομοταξία των μυκήτων, με πάνω από 64.000 είδη. Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την κυριαρχία των Ασκομυκήτων στην φυλλόσφαιρα των φυτών (Cordier et al. 2012).

### 4.2.1. ΑΣΚΟΜΥΚΗΤΕΣ

Μύκητες του γένους *Cladosporium* αποτέλεσαν τους πιο συχνά απαντούμενους μύκητες στην φυλλόσφαιρα των περισσότερων φυτών (Ζώνες 1, 3 και 4). Τα *Cladosporium* είναι ένα από τα μεγαλύτερα γένη και παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, περιλαμβάνοντας σήμερα περισσότερα από 772 είδη (Ramos-garcía et al. 2016). Μύκητες του γένους *Cladosporium* μπορούν να αποικίζουν ένα μεγάλο εύρος ξενιστών και συνήθως συναντώνται σε όλα τα είδη των φυτών. Συχνά απομονώνονται από έδαφος, τρόφιμα, χρώματα, υφάσματα και άλλα οργανικά μέσα ή αποικίζουν περιοχές που έχουν υποστεί προσβολή από φυτοπαθογόνα ως δευτερογενείς προσβολές (Levetin & Dorsey 2006). Επίσης, κονίδια των ειδών *Cladosporium* αποτελούν την πλειοψηφία των σπορίων μυκήτων που απαντώνται στον αέρα (Mullins 2001). Τα μικρά τους κονίδια είναι καλά προσαρμοσμένα για να μεταφέρονται εύκολα με τον αέρα σε μακρινές αποστάσεις. Άλλα είδη αυτού του γένους είναι φυτοπαθογόνα ή εμφανίζονται ως υπερπαράσιτα σε άλλους μύκητες (Heuchert et al. 2005). Είναι γνωστό ότι στα είδη του γένους *Cladosporium* κατατάσσονται κοινά ενδόφυτα και επίφυτοι μύκητες (Levetin & Dorsey 2006). Προηγούμενες μελέτες από τους Moulas et al. (2013) είχαν δείξει ότι μύκητες του γένους *Cladosporium* αποτελούν τους πιο συχνά απαντούμενους επίφυτους μύκητες. Μερικά είδη του γένους *Cladosporium* παρουσιάζουν ιατρικό ενδιαφέρον σε κλινικά εργαστήρια και μπορεί να προκαλέσουν αλλεργικές μυκητιάσεις των πνευμόνων (Crous & Schubert 2007).



Το *Cladosporium ramotenellum* (ζώνη 3) ανιχνεύθηκε στην φυλλόσφαιρα αρκετών φυτών. Το συγκεκριμένο είδος είναι ένα αρκετά κοινό σαπροφυτικό είδος που βρίσκεται σε διάφορα υποστρώματα, όπως ο αέρας και τα υπεράλμυρα νερά, με μια ευρεία γεωγραφική κατανομή (Crous et al. 2007). Το *Cladosporium subuliforme* (ζώνη 3) είναι ένα είδος που αποτελεί τμήμα του συμπλέγματος των μυκήτων *Cladosporium cladosporioides*, που περιγράφεται παρακάτω. Οι Walker et al. (2016) υποστηρίζουν ότι σχετίζεται με την εμφάνιση κηλίδωσης στα φύλλα του δένδρου *Pecan* (*Carya illinoensis*). Επίσης, έχει βρεθεί σε κίτρινες κηλίδες φύλλων φυτών πιπεριού στην Κούβα (Ramos-garcía et al. 2016).

Το *Cladosporium cladosporioides* (Ζώνη 4) είναι ένα από τα πιο κοινά σαπροφυτικά είδη, με παγκόσμια κατανομή και δεν εμφανίζει κάποιες ισχυρές περιβαλλοντικές προτιμήσεις για την ανάπτυξή του. Γενικά, αποικίζει αποσυντιθέμενη οργανική ύλη αλλά και ζωντανά φύλλα ως δευτερογενής εισβολέας ενώ απαντάται συχνά στον αέρα, το έδαφος, τα προϊόντα διατροφής και το νερό, σε κατεστραμμένα οικοδομικά υλικά και πολλά άλλα υλικά. Έχει βρεθεί, επίσης, ως κοινός ενδοφυτικός μύκητας (Bensch et al. 2012). Παρά το γεγονός ότι γενικά θεωρούνται σαπροφυτικά, μύκητες του είδους *C. cladosporioides* έχουν συσχετισθεί με φυτοπαθολογικές προσβολές. Οι Anilkumar και Seshadri (1975) αναγνώρισαν αυτόν τον μύκητα ως αιτιολογικό παράγοντα για την κηλίδωση φύλλων σε ηλιάνθο (*Helianthus annuus* L.). Επιπλέον, οι Li et al. (2008) ανέφεραν ότι η εμφάνιση ψώρας στην παπάγια (*Carica papaya*) στην Ταϊβάν, προκαλείται από *C. cladosporioides*.



**Εικόνα 19.** Συλλογή φύλλων πιπεριάς που παρουσιάζουν παθογένεια με κίτρινες κηλίδες, που προκαλούνται από το είδος *Cladosporium subuliforme*.

Μύκητες που ανήκουν στο είδος *Rachicladosporium* ανιχνεύθηκαν στην φυλλόσφαιρα αρκετών φυτών (ζώνες 8, 12, 13). Μύκητες του γένους *Rachicladosporium* έχουν απομονωθεί από φύλλα και κλαδιά στις ΗΠΑ (Crous et al., 2009), από κηλίδες φύλλων από το φυτό *Luculia* sp. στη Νέα Ζηλανδία (Crous et al. 2007) και από βελόνες του *Pinus monophylla* στην Ολλανδία (Crous et al. 2014). Μύκητες του γένους *Toxicocladosporium* όπως και το είδος *Toxicocladosporium banksia* (Ζώνη 8) ανιχνεύθηκαν στην φυλλόσφαιρα αρκετών φυτών. Το όνομα του συγκεκριμένου γένους καταδεικνύει την παραγωγή άφθονων πτητικών μεταβολιτών, οι οποίοι προκαλούν δερματικό εξάνθημα μέσα σε λίγα

λεπτά από το άνοιγμα ενός εμβολιασμένου τρυβλίου, και παρουσιάζουν τη μορφολογία των *Cladosporium* (Crous et al. 2007).

Μύκητες του είδους *Botrytis cinerea* (ζώνες 1 και 19) ανιχνεύθηκαν στην φυλλόσφαιρα των περισσότερων φυτών (ειδικά η Ζώνη 1). Μύκητες του συγκεκριμένου είδους αποτελούν κοινά φυτοπαθογόνα που προκαλούν ασθένειες σε λαχανικά, καλλωπιστικά φυτά και φρούτα, σε ζωντανά φυτά και κυρίως κατά την συγκομιδή και αποθήκευση. Ορισμένα, όπως η φράουλα ή το σταφύλι, συνήθως προσβάλλονται κατά την ωρίμανση στο φυτό ή και όταν είναι ακόμα άγουρα. Τα κονίδια (αγενή σπόρια) του *Botrytis cinerea* διασκορπίζονται με τον άνεμο και με το νερό της βροχής και προκαλούν νέες μολύνσεις. Ο μύκητας προκαλεί μεγάλες απώλειες ετησίως κατά την αποθήκευση φρέσκων φρούτων και λαχανικών, ειδικά σε αχλάδια, εσπεριδοειδή, μήλα, φράουλες, τομάτες και κρεμμύδια (Agris 1988). Τα περισσότερα σαπροτροφικά είδη έχουν ένα πολύ στενό εύρος ξενιστών, όμως μόνο το *B. cinerea* μπορεί να μολύνει ένα ευρύ φάσμα φυτών.



Εικόνα 20. Μόλυνση άμπελου από φυτοπαθογόνο *Botrytis cinere*.

Το γένος *Pezizales* sp. (ζώνη 7) αποτελεί το μόνο γένος των *Pezizomycetes* και περιλαμβάνει επίγεια, ημιυπόγεια και υπόγεια είδη (τρούφες). Επίσης περιέχει μια σειρά από είδη οικονομικής σημασίας, όπως μαύρες και άσπρες τρούφες, και τρούφες της ερήμου. Οι *Pezizales* μπορεί να είναι σαπροφυτικοί, μυκορριζικοί ή φυτικά παράσιτα, ενώ οι βιοτικές αλληλεπιδράσεις πολλών ειδών δεν είναι γνωστές. Τα είδη αυτά συλλέγονται από το έδαφος, το ξύλο, τα φύλλα και την κοπριά. Η μεγαλύτερη ποικιλία ειδών παρατηρείται στις εύκρατες περιοχές ή σε μεγάλο υψόμετρο. Αρκετά μέλη των οικογενειών *Sarcoscyphaceae* και *Sarcosomataceae* είναι κοινά σε τροπικές περιοχές (Hansen & Pfister 2015).



**Εικόνα 21.** Το είδος *Peziza badia* με ασκομάτια, που εμφανίζονται συχνά σε μικρές ομάδες σε επιφάνεια ξύλων.

Το είδος *Ceramothyrium carniolicum* (ζώνη 2), συγκαταλέγεται στην οικογένεια των *Chaetothyriaceae*. Τα είδη της συγκεκριμένης οικογένειας είναι κυρίως επίφυτα, αποικίζουν την επιφάνεια των φύλλων και το μυκήλιό τους αναπτύσσεται στην επιδερμίδα του ξενιστή, χωρίς να διεισδύει στον ιστό του ξενιστή (Hyde et al. 2012). Οι Batista and Ciferri (1962) τα χαρακτήρισαν ως φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, που σχηματίζουν χαρακτηριστικές κυλίδες καπνιάς στην επιφάνεια των φύλλων. Επίσης, έχουν βρεθεί ως άποικοι βραχώδων επιφανειών (Chomnunti et al. 2014). Σύμφωνα με Thauung (2006) οι κηλίδες καπνιάς (sooty molds) είναι ένας γενικός όρος ταξινόμησης για τους μύκητες των τάξεων *Capnodiiales* ή/και *Chaetothyriales*. Κοινά γένη και από τις δύο αυτές τάξεις συχνά απαντώνται να αποικίζουν μαζί τέτοιες κηλίδες καπνιάς σε φυτικά εκκρίματα, όπως για παράδειγμα μεταξύ άλλων και τα γένη *Cladosporium* και *Trichomerium*, που ταυτοποιήθηκαν εδώ στο ίδιο φυτό, στο *Pistacia lentiscus* της χειμερινής περιόδου.

Το γένος *Trichomerium* (ζώνες 4 και 8) κατατάσσεται στην οικογένεια *Trichomeriaceae* και αποτελεί φυτοπαθογόνο (Chomnunti et al. 2012). Το *Trichomerium* είναι ένα γένος επίφυτων μυκήτων που εμφανίζονται ως σκουρόχρωμες κηλίδες που αναπτύσσονται κυρίως στην επιφάνεια ζωντανών φύλλων ή ως σαπρόφυτα που τρέφονται στις εκκρίσεις εντόμων. Φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα είδη *Trichomerium* σχηματίζουν έναν μονοφυλετικό κλάδο μέσα στη τάξη *Chaetothyriales* (Chomnunti et al. 2012).

Στη φυλλόσφαιρα των φυτών που μελετήθηκαν καταγράφηκαν και μύκητες της Τάξης *Botryosphaeriales* (ζώνες 3 και 8). Οι μύκητες της Τάξης *Botryosphaeriales* απαντώνται συχνά σε ξυλώδη φυτά όπου μπορεί να είναι ενδοφυτικοί ή παθογόνοι. Η Τάξη αυτή θεωρείται ότι περιέχει μόνο μία οικογένεια, το *Botryosphaeriaceae*, και περίπου 25 γένη. Πολλά είδη της συγκεκριμένης οικογένειας είναι φυτοπαθογόνα ενός ευρέως φάσματος ξενιστών και είναι υπεύθυνα για πολλές ασθένειες. Όλα τα είδη της ομάδας συνδέονται με τα φυτά και πολλοί κατατάσσονται στα παθογόνα, που είναι γνωστό ότι προκαλούν ασθένειες σε ένα ευρύ φάσμα φυτών με οικολογική και οικονομική σημασία. Γενικά, προκαλούν συμπτώματα ασθένειας στα φυτά που έχουν εκτεθεί σε περιβαλλοντικές

καταπονήσεις όπως ξηρασία, παγετός, χαλάζι ή φυτά που έχουν υποστεί πρωτογενείς προσβολές από άλλα παθογόνα. Συνήθως σχετίζονται με καρκίνο και αμαύρωση των βλαστών του φυτού, που ακολουθείται από έκκριση ξηρής, καφέ-κοκκινωπής κολλώδους ουσίας και τελικά οδηγείται στον θάνατο του φυτού (Slippers et al., 2001). Μερικά είδη προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις στους ανθρώπους (Slippers & Wingfield 2007).

Επίσης, στις ζώνες αυτές, καταγράφηκε το είδος *Pestalotiopsis chamaeropsis* (ζώνες 3 και 8), ένας φυτοπαθογόνος μύκητας που απομονώθηκε από νεκρωτικές κηλίδες των φύλλων του θάμνου *Prostanthera rotundifolia*, στον οποίο σχηματίζει στους μίσχους μαύρα κονιδιώματα με ακρορριζικές απολήξεις και αποτελούν τις χαρακτηριστικές του δομές (Εικόνα 22) (Moslemi & Taylor 2015). Θεωρείται ότι τα είδη *Pestalotiopsis* έχουν εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή και γενικά, τα ενδοφυτικά είδη *Pestalotiopsis* ευνοούνται σε υψηλές θερμοκρασίες των τροπικών περιοχών (Liu et al. 2010). Οπότε, η ταυτοποίησή τους στα φυτά *Melissa officinalis* σε ένα Μεσογειακό περιβάλλον που δεν ευνοεί τόσο την ανάπτυξή τους είναι πιθανόν αποτέλεσμα της αερομεταφερόμενης διασποράς των σπορίων τους. Κάποια είδη έχουν αποκτήσει μεγάλη σημασία τα τελευταία χρόνια, καθώς βρέθηκε ότι παράγουν πολλούς σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες με ποικίλα δομικά χαρακτηριστικά, με αντικαρκινική, αντιμυκητιακή, αντιμικροβιακή και άλλες δράσεις (Jeewon et al. 2006). Έχουν απομονωθεί ως ενδόφυτα και υπάρχουν πολλές αναφορές ότι παράγουν νέες ενώσεις με φαρμακευτικές, γεωργικές και βιομηχανικές εφαρμογές (Xu et al. 2010; Xu et al. 2014).



Εικόνα 22. Σχηματισμός κονιδιωμάτων σε βλαστό θάμνου μέντας *Prostanthera rotundifolia*.

Ένα είδος της τάξης *Helotiales* που καταγράφηκε είναι το *Trimmatostroma cordae* (ζώνη 10). Οι βιολογικές σχέσεις των μυκήτων *Helotiales* στα οικοσυστήματα είναι ποικίλες, και τα μέλη αυτά έχουν περιγραφεί ως παθογόνα των φυτών, ενδόφυτα, μύκητες-θηρευτές, μυκορριζικοί σχηματισμοί, εκτομυκορριζικά παράσιτα, παρασιτικοί μύκητες, χερσαία και υδρόβια σαπροφυτικά, συμβιωτικοί μύκητες ριζών, και μύκητες σήψης ξύλου (Εικόνα 34). Το είδος *Trimmatostroma corda* (1837), με τον *T. salicis* Corda ως πρότυπο είδος, έχει καθιερωθεί ως σαπροφυτικός μύκητας που αποικίζει στον φλοιό. Βάση μοριακών αναλύσεων αλληλουχιών, το *Trimmatostroma* αποδείχθηκε ότι εμφανίζει μεγάλη



ετερογένεια και πρέπει πιθανώς να περιοριστεί στο *T. salicis* και λίγα στενά συνδεδεμένα είδη που σχετίζονται φυλογενετικά με την *Helotiales* (Diederich et al. 2010). Το γένος *Trimmatostroma* περιλαμβάνει μύκητες που αποικίζουν νεκρούς ή ζωντανούς φυτικούς ιστούς, αλλά έχουν απομονωθεί κι από ενδιαιτήματα με ακραίες συνθήκες όπως αλυκές, υπεράλμυρα νερά (Gunde-Cimerman et al. 2000), εδάφη της ερήμου και άνυδρες επιφάνειες που είναι εκτεθειμένες στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV) της ατμόσφαιρας (Butin et al. 1996). Είναι γνωστό ότι ο χρωματισμός του κυτταρικού τοιχώματος σε φυτοπαθογόνους μύκητες προσδίδει αυξημένη μηχανική αντοχή στα κύτταρα (Butler et al. 2001) έτσι ώστε να έχουν την δυνατότητα προσαρμογής σε έντονες εναλλαγές του ενδιαιτήματος που κατοικούν, όπως συμβαίνει στο περιβάλλον της Μεσογείου.



**Εικόνα 23.** Τρεις σχετικοί μύκητες *Helotiales* που παρουσιάζουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές που σχετίζονται με διαφορετικούς τρόπους ζωής (από αριστερά προς τα δεξιά): Μυτερή άκρη ερυσίβης *Fabrella tsugae* παράγει σκουρόχρωμα στίγματα στα δέντρα ξενιστές. Ενδοφυτικός μύκητας *Heyderia abietis* παράγει στίγματα σε νεκρές βελόνες ελάτης. Σαπροφυτικός μύκητας *Chlorenchelia versiformis* που αναπαράγεται σε σάπιο ξύλο.

Το είδος *Pleospora fallens* (ζώνη 15) κατατάσσεται στο πολυφυλετικό γένος *Phoma* και παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά του γένους αυτού και αναφέρεται, συχνά, ως ένα από τα πιο κοινά και άφθονα σπόρια των μυκήτων πάνω σε επιφάνειες φύλλων (Gruyter et al. 2012), οπότε αποτελεί ένα αναμενόμενο εύρημα της έρευνας αυτής. Συνώνυμο: *Phoma fallens*. Η πλειοψηφία των ειδών στο πλαίσιο του γένους *Phoma* έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με τα φυτά, προκαλώντας κηλίδες κυρίως στα φύλλα και στο στέλεχος του φυτού. Περίπου το 50% των ειδών *Phoma* αναγνωρίζονται ως φυτοπαθογόνοι μύκητες, (Bensch et al. 2005). Αν και τα περισσότερα είδη είναι παρόντα συνεχώς στο περιβάλλον ως σαπροφυτικοί οργανισμοί του εδάφους, πολλά είδη καθίστανται παθογόνα όταν βρεθεί ένας κατάλληλος ξενιστής. Το γένος περιλαμβάνει περαιτέρω διάφορα είδη που αναγνωρίζονται ως ενδοφυτικοί μύκητες και λειχήνες, καθώς και ομάδες που αποικίζουν το έδαφος, οργανικά υπολείμματα, και νερό. Επιπλέον, περίπου 10 είδη είναι γνωστά ως παθογόνα των ανθρώπων (Balis et al. 2006), και άλλων σπονδυλωτών, όπως τα βοοειδή και τα ψάρια, όπου μπορεί να επηρεάσουν έμμεσα την υγεία των ζώων με την παραγωγή τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών (Rai et al. 2009) (κυτοχλασίνη Α και Β, κοζικό οξύ, αφλατοξίνη). Ένας σχεδόν εντελώς ανεξερεύνητος βιότοπος του γένους *Phoma* είναι το θαλάσσιο περιβάλλον, στο οποίο τα είδη *Phoma* εντοπίζονται συχνά και είναι νέα για την επιστήμη.

Το είδος *Neoplatysporoides aloicola* (ζώνη 7) ανήκει στην οικογένεια *Pleosporaceae*. Το όνομα αντιστοιχεί στο φυτό *Aloe*, από το οποίο και απομονώθηκε το είδος αυτό. Το γένος *Neoplatysporoides* συσχετίστηκε με τον μαρασμό των άκρων της *Aloe ferox*, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν μπορεί να είναι σαπροφυτικό, όπως στην περίπτωση του συγγενικού του *Platysporoides*, το οποίο εμφανίζεται στα απορρίμματα φύλλων (Crous et al. 2015).



**Εικόνα 24.** *Neoplatysporoides aloicola*. Κονιδιόματα στο φύλλο του φυτού *Aloe ferox*, στην Τανζανία.

Οι μύκητες του γένους *Epicoccum* (ζώνη 9) κατατάσσονται στην οικογένεια *Pleosporaceae*. Οι *Epicoccum* είναι ευρέως διαδεδομένοι σαπροφυτικοί μύκητες, καθώς και κοινός παράγοντας δημιουργίας κηλίδων στα φύλλα. Επίσης, μπορούν να βρεθούν σε όλων των ειδών τα υποστρώματα (έδαφος, αέρα, λαχανικά, δημητριακά, κυτταρικά προϊόντα, κλπ.), και μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές ζημιές στις καλλιέργειες καλαμποκιού, σόγιας, σιταριού, βρώμης και άλλα (Weber 2006). Η θερμοανθεκτικότητα αυτού του μύκητα, ο οποίος αναπτύσσεται στους 37°C, θα μπορούσε να επιτρέψει να είναι ένα πιθανό ανθρώπινο παθογόνο, αν και οι λοιμώξεις που έχουν αναφερθεί δεν έχει επιβεβαιωθεί ότι οφείλονται στο *Epicoccum* (Hogan et al. 1996). Επίσης, τα σπόριά του μπορούν να προκαλέσουν αλλεργίες τύπου I του αναπνευστικού, όπως η αλλεργική ρινίτιδα και το άσθμα, και είναι ένα σημαντικό εξωτερικού και εσωτερικού χώρου αλλεργιογόνο σε αστικές κοινότητες και σε χώρους εργασίας (Green et al. 2003).

Δεν έχουν αναφερθεί μυκοτοξίνες που παράγονται από *Epicoccum* που να είναι επιβλαβής για τον άνθρωπο ή τα ζώα, όμως παράγει γνωστές τοξικές ουσίες (δευτερογενείς μεταβολίτες) που είναι βιολογικά δραστικές κατά των βακτηρίων, των μυκήτων, των ιών και ορισμένων ζωικών κυττάρων in vitro. Ορισμένες τοξίνες, όπως epicorazine B, έχουν αντιμυκητιακές και αντιβακτηριακές ιδιότητες (Mallea et al. 1991), ενώ άλλες αντιβιοτικές ουσίες που παράγονται είναι epicorazine B, ινδολ-3-ακετονιτρίλιο και flavirpin. Επίσης, οι epicoccamides (B-D) έχουν αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε κυτταρικές σειρές λευχαιμίας (Wangun et al., 2007), το epicoccone είναι ένα αντιοξειδωτικό, και epicocconone είναι ένα φυσικό φθορίζον χρώμα, το οποίο μπορεί να είναι χρήσιμο ως ένας φθορίζοντας δείκτης για τη συγγένεια πρωτεϊνών (Choi et al. 2006).

Πιο συγκεκριμένα, ο μύκητας *Epicoccum nigrum* (ζώνη 12) είναι ένας ευρέως διαδεδομένος σαπροφυτικός μύκητας, που έχει βρεθεί σε εσωτερικούς και εξωτερικούς χώρους. Αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μύκητες που ευθύνονται για την πρόκληση αναπνευστικών

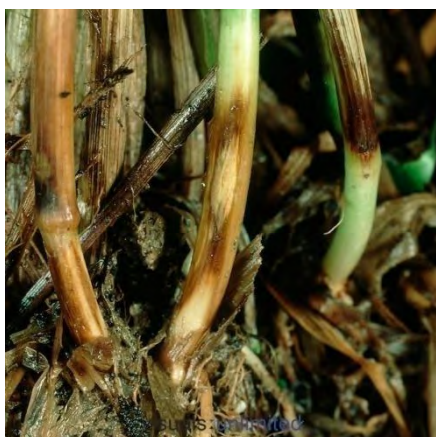
αλλεργικών διαταραχών (Bisht et al. 2004). Επίσης, αποτελεί σαπροφυτικό μύκητα που αποικίζει σε διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων και σχετίζεται με την πρωτογενή αποσύνθεση των φυτών (Andrews et al. 2000). Ωστόσο, το *Epicoccum nigrum* μπορεί να εμφανίσει ενδοφυτικό τρόπο ζωής σε ξενιστές μιας ποικιλίας φυτών που δεν παρουσιάζουν ταξινομική συσχέτιση, κάτι που υποδηλώνει ότι ο μύκητας αυτός αναπτύσσει μηχανισμούς προσαρμογής για να ξεπεραστούν τα διάφορα είδη άμυνας των φυτών (Schulz et al 2005).



**Εικόνα 25.** *Epicoccum nigrum*. Σχηματισμός αποικιών σε νεκρά φύλλα, όπου τα σποροδόχια είναι ορατά ως μαύρες κουκίδες.

Το είδος *Antennulariella placitae* (ζώνη 9) ανήκει στην τάξη *Capnoidiales*, και είναι ένα τελομορφικό γένος που σχετίζεται με σκουρόχρωμες κηλίδες στα φύλλα (sooty molds). Το γένος *Antennaria*, το οποίο διαθέτει 7 είδη, συμπεριλαμβανομένου και του *Antennulariella placitae*, παρουσιάζει ευρεία κατανομή, και απαντάται σε ζεστές εύκρατες έως τροπικές περιοχές, όπου αναπτύσσονται ως μαύρες σκούρες κυλίνδρες στα φυτά (Cheewangkoon et al. 2009)

Το γένος *Pseudocercospora* (Ζώνη 13) περιέχει είδη που είναι παθογόνα ή νεκροτροφικά. Τρία είδη και δύο ποικιλίες του *Pseudocercospora deighton* είναι γνωστό ότι σχετίζονται με τα συμπτώματα της ασθένειας κερκοσπορίωσης του σιταριού. Το διαγνωστικό σύμπτωμα της κερκοσπορίωσης είναι οι ελλειπτικές (σε σχήμα ματιού) κηλίδες των φύλλων (Εικόνα 26). Γενικά, οι ξενιστές τους είναι μέλη της οικογένειας *Poaceae* (Ποοειδή) (Robbertse et al. 1995). Οι μύκητες αυτοί είναι ευρέως διαδεδομένοι στην Ευρώπη, όπου είναι παρόν το φυτό-ξενιστής, και ευνοούνται από ήπιους χειμώνες και δροσερή άνοιξη, απαιτώντας υψηλή σχετική υγρασία και βροχερά εδάφη, συνθήκες που αντιπροσωπεύουν το Μεσογειακό κλίμα.



**Εικόνα 26.** Ασθένεια κερκοσπορίωσης (eyespot) από το είδος *Pseudocercospora herpotrichoides* που εμφανίζεται στη βάση του βλαστού του σίτου.

Το είδος *Microcyclospora tardicrescen* (ζώνες 14 και 18) βρέθηκε σε πρόσφατες μελέτες (Frank et al. 2010) ότι συνδέεται με κηλιδωτή σήψη-μηκυτίαση και κηλίδες με μορφή δαγκώματος μύγας (sooty blotch and flyspeck, SBFS) στις επιφάνειες των μήλων. Οι μύκητες του γένους *Microcyclosporella* είναι όμοιοι στη μορφολογία με τους μύκητες του γένους *Pseudocercospora*, αλλά διακρίνεται γενετικά και μορφολογικά από το *Pseudocercospora*. Οι μύκητες του γένους αυτού είναι επιφυτικοί και σχηματίζουν αποικίες στα μήλα που χαρακτηρίζονται από επιφανειακή εξάπλωση, χρώματος σκούρο καφέ. Με την ανάπτυξη τέτοιων αποικιών μπορούν να ενωθούν, με αποτέλεσμα να σχηματίσουν μαύρα ή σκουρόχρωμα τμήματα, ακόμα και σε ολόκληρη την επιφάνεια των μήλων. Έχουν απομονωθεί από οπωρώνες στην κεντρική Ευρώπη και βρίσκονται κυρίως στη Γερμανία και τη Σλοβενία (Frank et al. 2010). Από την βιβλιογραφία, όμως, είναι λίγα γνωστά για την οικολογία, την επιδημιολογία και τους ξενιστές των μυκήτων που προκαλούν την ασθένεια SBFS. Επίσης, ένα στέλεχος του *Microcyclospora tardicrescens* προσδιορίστηκε ως παραγωγός επικίνδυνων μυκοτοξινών του τύπου trichothecene για πρώτη φορά, κάτι που δίνει λόγο για παρακολούθηση αυτών των τροφιμογενών μυκήτων στο μέλλον (Surup et al. 2014).

Το είδος *Scoliciosporum umbrinum* (ζώνη 15) ανήκει στην οικογένεια *Lecanoraceae*. Το είδος αυτό σχηματίζει λειχήνες και βρίσκεται συνήθως σε σκιερά, ιζηματογενή και πυριγενή πετρώματα και σε άλλες περιοχές όπου απαντώνται συχνά πάνω σε χαλίκια, στο φλοιό δέντρων και στα φύλλα. Για παράδειγμα, σε βράχους με βασικό ή όξινο περιβάλλον, μνημεία, τοίχους, έδαφος, σκουριασμένο μέταλλο, κλαδιά και ξύλα (Dymytrova 2011). Γενικά, ευδοκιμούν κυρίως σε εύκρατες περιοχές και η φυλλόσφαιρα του Μεσογειακού κλίματος αποτελεί ένα ενδιαίτημα που απαιτεί την λιγότερη δυνατή προσαρμογή του μικροοργανισμού σε σχέση με τα υπόλοιπα ενδιαίτηματα που απαντάται. Επίσης, αυτό το είδος είναι αρκετά σύννηθες και διαδεδομένο στο βόρειο ημισφαίριο και έχει αντοχή στη ρύπανση και τον θρεπτικό εμπλουτισμό, που συμβαίνουν σε πάρκα, κήπους και δάση που βρίσκονται κοντά σε αστικές περιοχές. Το είδος δεν έχει καταγραφεί στο Νότιο Ημισφαίριο, ενώ εκτεταμένες έρευνες σε πιθανούς οικοτόπους στην Τασμανία έχουν αποκαλύψει μόνο



κοκκώδη αποικίες αγνώστων πράσινων άλγεων, που όμως δεν αποτελούν λειχήνες (Kantvilas 2012).



**Εικόνα 27.** Το είδος *Scoliciosporum umbrinum* που αναπτύσσεται σε νεκρά κλαδιά του φυτού *Pseudotsuga menziesii*.

Τα είδη του γένους *Cladophialophora* (ζώνη 21) φυλογενετικά ανήκουν στην Τάξη *Chaetothyriales*. Το γένος *Cladophialophora* περιλαμβάνει έναν αριθμό κλινικά σημαντικών ειδών εκτός από τα περιβαλλοντικά είδη. Τα είδη αυτά προκαλούν χρωμοβλαστομυκητίαση και άλλες μολύνσεις του δέρματος, καθώς επίσης και εγκεφαλικές λοιμώξεις, συχνά σε άτομα με ανοσοεπάρκεια (Badali et al. 2008). Υπάρχουν και αναμορφικά είδη του γένους *Cladophialophora* που ανήκουν στην Τάξη *Carphodiales* και διαχωρίζονται με βάση την οικολογία τους. Αρχικά ο Braun (1998) διαχώρισε τα *Cladophialophora*, που αποτελούν ευκαιριακά παθογόνα (*Chaetothyriales*), από τα κύρια σαπροφυτικά είδη ή τα είδη που σχετίζονται με τη φυλλόσφαιρα. Συγκεκριμένα, το είδος *C. scillae* είναι φυτικό παθογόνο και έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με κηλίδες των φύλλων σε ζωντανά φύλλα του φυτού *Scilla peruviana* (Εικόνα 28). Ωστόσο δεν έχει βρεθεί κάποια ειδικότητα προς τους ξενιστές του μύκητα αυτού (Crous & Schubert 2007). Τα κονίδια του διασπείρονται σε όλη την καλλιεργητική περίοδο από τη βροχή και τον άνεμο, και μεταφέρονται σε υγιή φρούτα, φύλλα και κλαδιά, όπου προκαλούν νέες μολύνσεις (Crous & Schubert 2007).



**Εικόνα 28.** *Cladophialophora scillae*. Χαρακτηριστικές αποικίες σε ετοιμοθάνατα φύλλα της *Scilla peruviana*.

#### 4.2.2. ΒΑΣΙΔΙΟΜΥΚΗΤΕΣ

Εκτός των Ασκομυκήτων ανιχνεύθηκε και σημαντικός αριθμός ζυμομυκήτων που ανήκουν στους Βασιδιομύκητες και εμφανίζονται αρκετά συχνά στην φυλλόσφαιρα φυτών (Jumpponen and Jones 2009). Το φύλο των *Basidiomycota* περιλαμβάνει μερικούς από τους πιο γνωστούς μύκητες και συνολικά περιλαμβάνει περίπου 25.000 γνωστά είδη. Μονοκύτταροι και διμορφικοί βασιδιομύκητες με στάδιο σταθερής ελεύθερης μονοκυτταρικής διαβίωσης κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους αναγνωρίζονται ως βασιδιομυκητιακές ζύμες (Boekhout et al. 2011). Απαντώνται και στα τρία γνωστά φύλα των βασιδιομυκήτων, δηλαδή στα *Agaricomycotina*, *Pucciniomycotina* και *Ustilaginomycotina*.

Στην φυλλόσφαιρα εντοπίστηκαν μύκητες της οικογένειας *Tremellaceae* (ζώνη 9) που ανήκει στην Τάξη *Tremellales*. Η οικογένεια αυτή παρουσιάζει ευρεία κατανομή, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις ειδών μπορεί να περιορίζονται σε εύκρατες ή τροπικές περιοχές. Περιέχει τόσο τελομορφικά όσο και αναμορφικά γένη, τα περισσότερα από τα οποία είναι ζύμες. Όλα τα τελομορφικά είδη μυκήτων στην *Tremellaceae* είναι παράσιτα άλλων μυκήτων (Ασκομυκήτων και Βασιδιομυκήτων). Συνήθως παρασιτούν σε είδη που αναπτύσσονται σε νεκρό ξύλο θάμνων και δέντρων και έχουν τη δυνατότητα να προσαρμοστούν σε περιοδικά άγονα περιβάλλοντα (Chen et al. 1998). Τα αναμορφικά είδη των μυκήτων *Tremellaceae* είναι ζύμες και δεν παρουσιάζουν περιορισμό ως προς τον ξενιστή ή το υπόστρωμά τους. Σημαντικά γένη της οικογένειας αυτής αποτελούν το *Tremella*, δύο είδη του οποίου είναι βρώσιμα και καλλιεργούνται για εμπορικούς λόγους, και το γένος *Cryptococcus*, διάφορα είδη του οποίου είναι παθογόνα των ανθρώπων που προκαλούν κρυπτοκόκκωση (Bahn & Jung 2013).

Ένα άλλο είδος της τάξης *Tremellales* που βρέθηκε στην φυλλόσφαιρα των φυτών που μελετήθηκαν είναι το *Vishniacozyma carnescens* (Ζώνη 4). Οι ζύμες του γένους *Vishniacozyma* είναι ευρέως διαδεδομένες και έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν κάτω από τεράστιες αλλαγές των περιβαλλοντικών συνθηκών (Liu et al. 2016). Όσον αφορά την οικολογία των μυκήτων που αποτελούν ζύμες, σε επίπεδο κοινότητας επηρεάζονται από τη γεωγραφική θέση και το υπόστρωμά τους (έδαφος ή φυλλόσφαιρα), τα οποία καθορίζουν την ποικιλότητα και την αφθονία των ειδών. Ωστόσο, οι επιπτώσεις του υποστρώματος βρέθηκαν να είναι οι σημαντικότερες, με τα διάφορα είδη ζύμης να μπορούν να αποικίσουν μόνο σε έναν από τους δύο τύπους υποστρωμάτων, χωρίς να βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ των ειδών ζύμης και μεμονωμένων φυτικών ειδών (Yurkov et al. 2004).

Επίσης στα φύλλα των μελετούμενων φυτών ανιχνεύθηκαν μύκητες του γένους *Cryptococcus* (Ζώνη 7). Μύκητες του γένους *Cryptococcus* είναι σημαντικοί παθογόνοι μύκητες με σαπροβιοτικούς και παρασιτικούς κύκλους ζωής σε φυσικά περιβάλλοντα ή ζωικούς ξενιστές. Ιδιαίτερα η ικανότητα του *Cryptococcus* να προκαλέσει θανατηφόρα μηνιγγοεγκεφαλίτιδα σχετίζεται με την ικανότητά του να αναδιαμορφώνει και να βελτιστοποιεί τις μεταβολικές και φυσιολογικές του ιδιότητες ανάλογα με τα εξωτερικά ερεθίσματα (Bahn & Jung 2013). Ένα άλλο βασικό χαρακτηριστικό των παθογόνων ειδών *Cryptococcus* είναι η ικανότητά τους να επιβιώνουν σε στρεσογόνες περιβαλλοντικές

συνθήκες, στις οποίες εκτίθενται ξενιστές και φυσικά περιβάλλοντα, καθώς επίσης εμφανίζουν και ανθεκτικότητα σε συνθήκες υψηλής ακτινοβολίας (Dadachova, 2008), διαθέτοντας, έτσι, την ικανότητα προσαρμογής στις συνθήκες ενός Μεσογειακού περιβάλλοντος. Ακόμα, κάποια είδη *Cryptococcus* έχουν απομονωθεί από μη λειτουργικούς πυρηνικούς αντιδραστήρες του Τσερνομπίλ (Khajo et al. 2011).

Εκτός των παραπάνω βασιδιομυκήτων που ανήκουν στην Τάξη *Tremellales*, ανιχνεύθηκαν και βασιδιομύκητες της Τάξης *Sporodiobolales* όπως ο μύκητας *Symmetrospora gracilis* (Ζώνη 3) που αποτελεί είδος ζυμομύκητα (Wang, et al. 2016; Wang, Groenewald, et al. 2016). Το συνώνυμό του *Sporobolomyces gracilis* βρέθηκε και απομονώθηκε από φύλλα φυτών στα δάση της βόρειας και βορειοανατολικής Κίνας (Wang 2004).

Το *Malassezia sympodialis* (Ζώνες 9 και 10) είναι ένα είδος του γένους *Malassezia*. Έχουν μια χαρακτηριστική φυσιολογική ιδιότητα, κατά την οποία τα λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα. Τα είδη αυτά έχουν μία ανάγκη για συμπλήρωση των λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας *in vitro* στο μέσο καλλιέργειας, κι έτσι προκύπτει ο όρος λιπόφιλες ζύμες, ο οποίος εφαρμόζεται στα είδη αυτού του γένους (Gueho et al. 1996). Είναι ένα από τα πιο κοινά είδη που βρέθηκαν στο δέρμα υγιών και ασθενών ατόμων. Θεωρείται ότι είναι μέρος της φυσιολογικής ανθρώπινης μικροχλωρίδας του δέρματος και είναι κοινό συστατικό της χλωρίδας όλων, σχεδόν, των θερμόαιμων ζώων. Συχνά, έχει συμβιωτική σχέση με τον ξενιστή του, αλλά μπορεί να δράσει ως παθογόνο που προκαλεί έναν αριθμό διαφορετικών ασθενειών του δέρματος, όπως η ατοπική δερματίτιδα (Gaitanis et al. 2013). Επίσης, σχετίζονται και με φυτικό υλικό και συναντώνται σε δάση, όπου οι κοντινότεροι συγγενείς του *Malassezia* είναι παθογόνα των φυτών, όπως ερυσιβοειδή και σκουριά (Saunders et al. 2012). Ωστόσο, μεταξύ των Βασιδιομυκήτων μόνο τα γένη *Malassezia* και *Cryptococcus* είναι συχνά ανθρώπινα παθογόνα.

Επίσης, ανιχνεύθηκε το είδος *Serpula himantioides* (Ζώνη 6 και 15), το οποίο αναπτύσσεται στον ξυλώδη ιστό κωνοφόρων δέντρων. Γενικά, το γένος *Serpula* ανήκει στην ομάδα των μυκήτων που είναι γνωστοί ως *Boletes*, το οποίο αποτελεί ένα πολύ ιδιαίτερο είδος εδώδιμων μανιταριών. Ο μύκητας *Serpula himantioides* είναι από τους λιγότερο γνωστούς, φυσικός συγγενής του μύκητα ξηρής σήψης *Serpula lacrymans*, ο οποίος είναι γνωστός για την καταστροφή ανεπαρκώς αεριζόμενων κτιρίων, συμπεριλαμβανομένων και κατοικιών. Παρά το γεγονός ότι και τα δύο είδη αναπτύσσονται σε ξυλώδη υλικά, ο *S. himantioides* βρίσκεται κυρίως στη φύση, ενώ ο *S. lacrymans* απαντάται κυρίως στο εσωτερικό κτιρίων. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο μύκητας *S. himantioides* προκαλεί σήψη των άκρων της ελάτης *Douglas* (Koch & Thomsen 2003). Στη βόρεια Ευρώπη ο *S. himantioides* έχει αναγνωριστεί μόνο σποραδικά σε Ευρωπαϊκή και Ιαπωνική πεύκη, Νορβηγική ερυθρελάτη, δασική πεύκη και ελάτη *Douglas*, ενώ δεν έχει βρεθεί σε μεσογειακό οικοσυστήματα (<http://eol.org/pages/191197/maps>).

Τέλος, στην φυλλόσφαιρα κάποιων φυτών ανιχνεύθηκε ο βασιδιομύκητας *Golubevia* (ή *Tilletiopsis*) *pallescent* (Ζώνη 5) που ανήκει στην κλάση των *Exobasidiomycetes* και περιλαμβάνει επίφυτους μύκητες της φυλλόσφαιρας, κυρίως φυτοπαθογόνους. Είναι μια κατηγορία μυκήτων που μερικές φορές σχετίζονται με τις μη φυσιολογικές αποφύσεις των

ιστών των φυτών, που είναι γνωστές ως όζοι (Wang et al. 2016). Το είδος *Tilletiopsis pallescens* έχει βρεθεί με μεγαλύτερη συχνότητα σε φύλλα μολυσμένα από ερυσίβη σε σύγκριση με υγιή φύλλα κατά τη περίοδο ξηρών θερινών μηνών (Urquhart et al. 1994). Στελέχη του συγκεκριμένου είδους έχουν αναφερθεί ως επίφυτοι μύκητες που έχουν την ικανότητα να ανταγωνίζονται μύκητες του είδους *Sphaerotheca fulginea* που προκαλεί την ασθένεια ωίδιο σε φυτά αγγουρίου (Urquhart & Punja 1997). Η ικανότητα τους αυτή έχει αποδοθεί στην παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων και αντιμυκητιακών ουσιών που αναστέλουν την ανάπτυξη του ωιδίου στην φυλλόσφαιρα των φυτών (Urquhart & Punja 2002).

## 5. Τελικά Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης έδειξαν ότι η εποχικότητα αποτελεί το κύριο παράγοντα που καθορίζει την δομή της κοινότητας των μυκήτων στην φυλλόσφαιρα 8 φυτών που βρέθηκαν σε ένα κλασσικό Μεσογειακό οικοσύστημα. Αντίθετα το είδος του φυτού δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην δομή της κοινότητας των επίφυτων μυκήτων εντός του ίδιου οικοσυστήματος. Η φυλογενετική ανάλυση της κοινότητας των επιφύτων μυκήτων έδειξε ότι αυτή αποτελούνταν κυρίως από (α) Ασκομύκητες που έχουν χαρακτηριστεί από προηγούμενες μελέτες είτε ως φυτοπαθογόνα (*Botrytis cinerea*), είτε ως αερομεταφερόμενοι μύκητες ή ευκαριακά παθογόνα (*Cladosporium*) και (β) Βασιδιομύκητες και ειδικότερα ζύμες που ανήκουν στα γένη *Cryptococcus* και *Malassezia* που προκαλούν σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο αλλά και φυτοπαθογόνους μύκητες. Γενικότερα δεν εντοπίστηκαν μύκητες που να εμφανίζουν χαρακτηριστική περιοδικότητα ή εκλεκτικότητα ως προς το φυτό επί του οποίου αναπτύσσονται. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην πιο συστηματική και σε βάθος μελέτη της ποικιλότητας των μυκήτων στα παραπάνω δείγματα χρησιμοποιώντας τεχνικές αλληλούχισης νέας γενεάς που δίνουν την δυνατότητα ανίχνευσης και των πιο σπανίων μελών της μικροβιακής κοινότητας.

## 6. Βιβλιογραφία

- Andrews JH, Harris RF (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 38: 145–180.
- Andrews, J.H. & Harris, R.F., 2000. The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol* 38.
- Arnold, A.E. et al., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* 100.

- Badali, H. et al., 2008. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. *STUDIES IN MYCOLOGY* 61: 175–191., pp.175–191.
- Bahn, Y. & Jung, K., 2013. Stress Signaling Pathways for the Pathogenicity of *Cryptococcus*. *ASM*, 12(12), pp.1564–1577.
- Balis, E., Velegraki, A. & Fragou, A., 2006. Lung mass caused by *Phoma exigua*. *RICHTS LINK*, (October 2005), pp.552–555.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E., 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89.
- Beattie, G.A., 2002. Leaf surface waxes and the process of leaf colonization by microorganisms. *Phyllosphere Microbiology*.
- Bensch, K. et al., 2005. Studies in Mycology. *STUDIES IN MYCOLOGY* 72: 1–401., pp.1–401.
- Bisht, V., Singh, B.P. & Gaur, S.N., 2004. Purification and Characterization of a Major Cross-Reactive Allergen from *Epicoccum purpurascens*. *Allergy and Immunology*, 110007, pp.217–224.
- Boekhout, T. et al., 2011. Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Basidiomycetous Yeasts.
- Braun U, (1998). A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (Phytopathogenic Hyphomycetes). Vol. 2. IHW-Verlag, Eching.
- Bunster, L. et al., 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Appl Environ Microbiol*, 55, 1340–1345.
- Butin H, Pehl L, de Hoog GS, Wollenzien U, 1996. *Trimmatostroma Abietis* sp. nov. (hyphomycetes) and related species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69: 203–209.
- Butler MJ, Day AW, Henson JM, Money NP, 2001. Pathogenic properties of fungal melanins. *Mycologia* 93: 1–8.
- Cheewangkoon, R. et al., 2009. Myrtaceae , a cache of fungal biodiversity. *Persoonia*, pp.55–85.
- Chen C-J. (1998). Morphological and molecular studies in the genus *Tremella*. Berlin: J. Cramer.
- Choi, H., Veal, D.A. & Karuso, P., 2006. Epicocconone , A New Cell-Permeable Long Stokes ' Shift Fluorescent Stain for Live Cell Imaging and Multiplexing. *Journal of Fluorescence*, 16(4).
- Chomnunti, P. et al., 2012. Trichomeriaceae , a new sooty mould family of Chaetothyriales. *Fungal Diversity*, pp.63–76.
- Chomnunti, P., Hongsanan, S., Aguirre-Hudson, B., Tian, Q., Peršoh, D., Dhami, M.K., Alias, A.S., Xu, J., Liu, X., Stadler, M. & Hyde, K.D. (2014) The sooty moulds. *Fungal Diversity* 66 (1): 1–36.
- Cordier T., Robin C., Capdevielle X, Fabreguettes O., et al. (2012) The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist* 196: 510–519

- Corpe, W.A. & Rheem, S., 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol Ecol*, 62, 243–249.
- Crous et al., 2015. *Neoplatysporoides aloicola*. *Fungal Planet* 333, 34, pp.196–197.
- Crous, P.W. et al., 2007. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *STUDIES IN MYCOLOGY* 58: 33–56., (2006), pp.33–56.
- Crous, P.W. et al., 2014. Fungal Planet description sheets : 214 – 280. *Persoonia* 32, pp.184–306.
- Crous & Schubert, 2007. Opportunistic , human-pathogenic species in the Herpotrichiellaceae are phenotypically similar to saprobic or phytopathogenic species in the. *STUDIES IN MYCOLOGY* 58, (2005), pp.185–217.
- Diederich, P. et al., 2010. Four new lichen-associated *Trimmatostroma* species ( hyphomycetes ). *Bull. Soc. Nat. luxemb.* 111 (2010), pp.47–56.
- Dingman, D.W., 2000. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest, and source. *Appl Environ Microbiol* , 66, 1077–1083.
- Dymytrova, L.Y.V.D., 2011. NOTES ON THE GENUS *SCOLICIOSPORUM* ( LECANORALES , ASCOMYCOTA ) IN UKRAINE. *Polish Botanical Journal*, 56(1), pp.61–75.
- E J Urquhart, Z K Punja (2002) Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(3): 219-229
- E. J. Urquhart, Z. K. Punja (1997) Epiphytic growth and survival of *Tilletiopsis pallescens*, a potential biological control agent of *Sphaerotheca fuliginea*, on cucumber leaves. *Canadian Journal of Botany*, 1997, Vol. 75, No. 6 : pp. 892-901
- Frank, J. et al., 2010. *Microcyclospora* and *Microcyclosporella* : novel genera accommodating epiphytic fungi causing sooty blotch on apple. *Persoonia* 24, pp.93–105.
- Frank Surup, Ajda Medjedović, Michael Szczygielski, Hans-Josef Schroersand Marc and Stadler (2014) *J. Agric. Food Chem.*, pp 3525–3530
- Gaitanis, G. et al., 2013. Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts : Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 31(4), pp.455–463. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.01.012>.
- Green, B.J., Mitakakis, Z. & Tovey, E.R., 2003. Allergen detection from 11 fungal. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, pp.285–289.
- Gruyter, J. De et al., 2012. Studies in Mycology. *STUDIES IN MYCOLOGY* 75, pp.1–36.
- Gueho, E., Midgley, G. & Guillot, J., 1996. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, pp.337–355.
- Gunde-Cimerman N, Zalar P, de Hoog GS, Plemenitas A, 2000. Hypersaline waters in salterns D natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 235–240.
- Hansen, K. & Pfister, D.H., 2015. *Mycological Society of America Systematics of the*

- Pezizomycetes : The Operculate Discomycetes Systematics of the Pezizomycetes-the. *Mycologia*, 98(6), pp.1029–1040.
- He, Y.H. et al., 2012. Oligo-DNA custom microarray for monitoring major pathogenic and non-pathogenic fungi and bacteria in the phyllosphere of apple trees. *PLoS ONE*, 7(3).
- Health Research Unit, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Albany, California 947102
- Herrera, M.L. et al., 2009. Strain-Dependent Variation in 18S Ribosomal DNA Copy Numbers in *Aspergillus fumigatus* Strain-Dependent Variation in 18S Ribosomal DNA Copy Numbers in *Aspergillus fumigatus* ☐. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*.
- Hirano, S.S. & Upper, C.D., 1989. Diel variation in population size and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* on snap bean leaflets. *Appl Environ Microbiol*, 55.
- Hogan, M.B. et al., 1996. Secondary to *Epicoccum*. *CHEST*, 110(3), pp.854–856. Available at: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.110.3.854>.
- Hoog, G.S., Guarro J, Gené J, Figueras MJ. (2000). *Atlas of clinical fungi*, 2nd ed CBS, Utrecht and Universitat Rovira i Virgili
- Inacio, J, P. Pereira, M. de Carvalho, A. Fonseca, M.T. Amaral-Collaco, I.S.-M., 2002. Estimation and Diversity of Phylloplane Mycobiota on Selected Plants in a Mediterranean – Type Ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology*, pp.344–353.
- Jeewon, R. et al., 2006. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(2003), pp.372–383.
- Jumpponen A, Jones K.L (2009) Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist* 184: 438–448
- Jumpponen, A. & Jones, K.L., 2010. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytologist*, pp.496–513.
- Kantvilas, G., 2012. Observations on the genus *Scoliciosporum* in Australia , with the description of a second species of *Jarmania*. *The Lichenologist*, (June 2008).
- Karpouzias, D.G. et al., 2014. Effects of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi used as indicators of pesticide soil microbial toxicity. *Ecological Indicators*, 39, pp.44–53.
- Khajo, A. et al., 2011. Protection of Melanized *Cryptococcus neoformans* from Lethal Dose Gamma Irradiation Involves Changes in Melanin ' s Chemical Structure and Paramagnetism. *PLoS ONE*, 6(9).
- Kinkel, L.L., 1997. MICROBIAL POPULATION. *Annu. Rev. Phytopathol.*, (35), pp.327–347.
- Koch, B.J. & Thomsen, I.M., 2003. *Serpula himantoides* , *Heterobasidion annosum* and *Calocera viscosa* as butt rot fungi in a Danish Douglas-fir stand. *For. Path.*, 33, pp.5–10.
- Leveau, J.H.J. & Lindow, S.E., 2001. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of



- bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *PNAS*, 98.
- Levetin, E. & Dorsey, K., 2006. Contribution of leaf surface fungi to the air spora. *Aerobiologia*, pp.3–12.
- Li, D.M. et al., 2008. *Coniosporium epidermidis* sp. nov., a new species from human skin. *STUDIES IN MYCOLOGY* 61, pp.131–136.
- Li, J.Y., Harper, J.K., Grant, D.M., Tombe, B.O., Bashyal, B., Hess, W.M. and Strobel, G.A. (2001). Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenine with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry*.
- Lighthart, B., 1997. The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiol Ecol*, 23.
- Lindahl, D. et al., 2013. Methods Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user ' s guide. *New Phytologist*, (2004).
- Lindow, S.E. & Brandl, M.T., 2003. MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 69(4), pp.1875–1883.
- Lindow, S.E. & Leveau, J.H.J., 2002. Phyllosphere microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), pp.238–243.
- Mallea, M. et al., 1991. Comparison between antifungal and antibacterial activities of several strains of *Epicoccum purpurascens* from the Mediterranean area. *Mycopathologia*, pp.83–88.
- Manceau, C.R. & Kasempour, M.N., 2002. In Endophytic versus epiphytic colonization of plants: what comes first? In *Phyllosphere Microbiology*.
- Marshall, W.A., 1997. Seasonality in Antarctic Airborne Fungal Spores. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 63(6), pp.2240–2245.
- Mariano, R.L.R. & McCarter, S.M., 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. *Microbial Ecol*, 26.
- McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.I., 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4554–4559
- Mechaber, W., 2002. Mapping uncharted territory: nanoscale leaf surface topology. *Phyllosphere Microbiology*.
- Morris, C.E. et al., 1997. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 63.
- Morris, C.E. et al., 2002. Biofilms on leaf surfaces: implications for the biology, ecology and management of populations of epiphytic bacteria. In *Phyllosphere Microbiology*. pp. 139–155 St Paul, USA: APS Press
- Moslemi, A. & Taylor, P.W.J., 2015. *Pestalotiopsis chamaeropsis* causing leaf spot disease of round leaf mint-bush ( *Prostanthera rotundifolia* ) in Australia. *Australasian Plant Dis. Notes*.



- Moulas, C. et al., 2013. Effects of systemic pesticide simidacloprid and metalaxyl on the phyllosphere of pepper plants. *BioMedResearchInternational*, 2013.
- Mullins, J. (2001). Microorganisms in outdoor air. In R. A. Samson & J. D. Miller (Eds.), *Microorganisms in Home and indoor work Environments: diversity, Health Impacts, Investigation and control* (Flannigan B (pp. 3–16). London: Taylor & Francis.
- Osono, T., 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *NRC Research Press*.
- Papen, H. et al., 2002. Chemolithoautotrophic nitrifiers in the phyllosphere of a spruce ecosystem receiving high atmospheric nitrogen input. *Curr Microbiol*, 44, 56–60.
- Penuelas et al., 2012. Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. *plant biology*, 14, pp.565–575.
- Perazzolli, M. et al., 2014. Resilience of the Natural Phyllosphere Microbiota of the Grapevine to. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12), pp.3585–3596.
- Polizzotto, R., et al., 2009. Attività di ceppi endofitici di *Alternaria* spp. nel controllo di *Plasmopara viticola*. *Journal of Plant Pathology*, 91, 79-80.
- Porter, T.M. & Golding, G.B., 2011. Methods Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer ( ITS ) metagenomic amplicons ? *New Phytologist*, pp.775–782.
- Rai, M. et al., 2009. Phoma Saccardo : Distribution , secondary metabolite production and biotechnological applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(March), pp.182–196.
- Rasche, F. et al., 2006. Structural characteristics and plant-beneficial effects of bacteria colonizing the shoots of field grown conventional and genetically modified T4-lysozyme producing potatoes. *Plant Soil* 289.
- Ramos-garcía, B. et al., 2016. Morphology and phylogeny of *Cladosporium subuliforme*, causing yellow leaf spot of pepper in Cuba. *Mycotaxon*, 131(September), pp.693–702.
- Robbertse, B., Campbell, G.F. & Crous, P., 1995. Revision of *Pseudocercospora*-like species causing eyespot disease of wheat. *S. Afr. J. Bot.*, 61(1): 43-48, 61(1), pp.43–48.
- Rousidou, C. et al., 2010. European Journal of Soil Biology Repeated application of diluted olive mill wastewater induces changes in the structure of the soil microbial community. *European Journal of Soil Biology*, 46(1), pp.34–40.
- Saunders, C.W., Scheynius, A. & Heitman, J., 2012. *Malassezia* Fungi Are Specialized to Live on Skin and Associated with Dandruff , Eczema , and Other Skin Diseases. *PLoS Pathogens*, 8(6), pp.6–9.
- Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661–686.
- Slippers, B. & Wingfield, M.J., 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants : diversity , ecology and impact. *fungal biology reviews*, 21, pp.90–106.

- Sundin, G.W., 2002. Ultraviolet radiation on leaves: its influence on microbial communities and their adaptations. *Phyllosphere Microbiology*.
- Suslow, T.V., 2002. Production practices affecting the potential for persistent contamination of plants by microbial foodborne pathogens. *Phyllosphere Microbiology*.
- Thaung MM. 2006. Biodiversity of Phylloplane ascomycetes in Burma. *Australas Mycol* 25:5–23.
- Thompson, I.P. et al., 1993. Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet ( *Beta vulgaris* ). *Plant and Soil* 150, pp.177–191.
- Urquhart, E. J., Menzies, J.G., and Punja, Z.K. (1894). Growth and biological control activity of *Tilletiopsis* species against powdery mildew [*Sphaerotheca wigniae*] on greenhouse cucumbers. *Phytopathology* , 84: 341 – 356
- Varanda, C.M.R. et al., 2016. Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*.
- Vokou, D. et al., 2012. Exploring Biodiversity in the Bacterial Community of the Mediterranean Phyllosphere and its Relationship with Airborne Bacteria.
- Walker, C. et al., 2016. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. *Genetics and Molecular Research*, 15(3).
- Wang, Q., Begerow, D., et al., 2016. Multigene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina. *Studies in Mycology*, 81, pp.55–83. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.004>.
- Wang, Q., Yurkov, A.M., et al., 2016. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. *Studies in Mycology*, 81, pp.149–189. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.002>.
- Wang, Q., Groenewald, M., et al., 2016. Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within Pucciniomycotina determined from multigene sequence analyses. *Studies in Mycology*, 81, pp.27–53. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.08.002>.
- Whipps, J.M. et al., 2008. Human pathogens and the phyllosphere. *Adv Appl Microbiol* 64.
- Whipps, J.M. et al., 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol*.
- Wilson, C.L. et al., 1990. Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Appl Environ Microbiol*
- Xu, J., Ebada, S.S. & Proksch, P., 2010. Pestalotiopsis a highly creative genus : chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Diversity*, pp.15–31.
- Xu, J., Yang, X. & Lin, Q., 2014. Chemistry and biology of Pestalotiopsis -derived natural products. *Fungal Diversity*, pp.37–68.

- Yang, C.H. et al., 2001. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), pp.3889–3894.
- Yurkov AM, Maksimova IA, Chernov IY (2004). The comparative analysis of yeast communities structure in birch forests of European Russia and Western Siberia. *Mikol Fitopatol* 38:71–79
- Zak, J.C., 2002. Implications of a leaf surface habitat for fungal community structure and function. *Phyllosphere Microbiology*.